

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

AVALIAÇÃO DO SILENCIAMENTO GÊNICO EM PLANTAS UTILIZANDO
ESTRATÉGIAS BASEADAS EM dsRNAs.

SANDRA MARIA DE SOUZA
Bióloga/UNESC

Dissertação apresentada como um dos
requisitos à obtenção do Grau de
Mestre em Fitotecnia
Área de Concentração Fitossanidade

Porto Alegre (RS), Brasil
Março de 2006

HOMOLOGAÇÃO

Dedico

Aos meus amados filhos Giovan e Grégory Lopes

Pela compreensão, amor e carinho!

Agradeço

Aos meus familiares

Aos meus pais, Antonio de Souza e Irma Ramos de Souza,

pelo carinho, dedicação e amor!

A minha querida irmã, Lurdes, pelo carinho, incentivo e amizade!

Aos meus sobrinhos, Flávio, Flávia, Égler e Lays, pelo carinho!

Aos meus amigos

A minha amiga Célia Maria Gargaro de Souza, pelo carinho, apoi e incentivo!

A minha amiga Jaqueline de Medeiros, pela eterna amizade e incentivo!

A minha amiga Laís Gargaro de Souza, pelo carinho!

A minha amiga Mônica de Medeiros Silva, pela amizade e dedicação!

Ao meu amigo Geraldo Echeli, pela amizade e apoio!

Ao meu amigo Ricardo Gargaro de Souza, pela amizade, incentivo e apoio!

AGRADECIMENTOS

Ao professor Marcelo Gravina de Moraes, pela orientação e dedicação.

Ao professor Ribas Vidal pela colaboração.

Aos meus amigos, Caren Cavichioli Lamb, Flávia Vanina Ferreira e Marcos Vinícios de Souza pela paciência, dedicação e auxílio.

Aos demais colegas de laboratório de Fitopatologia Molecular: Adriana Corrent, Alex Corrêa, Jéferson Mateus Dariva e Jhorannes Humbertus Falcade, pelo apoio.

Aos demais professores, colegas e funcionários do departamento de Fitossanidade, em especial a Marisa secretária da pós-graduação e aos funcionários Miguel e Valmor, pelos momentos de descontração na praça de alimentação.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade de realização do Curso de Mestrado.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

A todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação, meu sincero agradecimento.

AVALIAÇÃO DO SILENCIAMENTO GÊNICO EM PLANTAS UTILIZANDO ESTRATEGIAS BASEADAS EM dsRNAs^{1/}

Autora: Sandra Maria de Souza
Orientador: Marcelo Gravina de Moraes

RESUMO

O silenciamento gênico tem sido utilizado extensivamente para facilitar a investigação de eventos da biologia vegetal. Ele pode ser induzido de diferentes modos, sendo que o passo chave para sua ocorrência é a presença de RNA fita dupla (dsRNA). A fim de avaliar um método rápido de obtenção de silenciamento para análise funcional em larga escala, foi inoculado dsRNA ou siRNA diretamente em folhas de plantas de arroz e de *Nicotiana benthamiana*. Os dsRNAs de seqüências do gene *pds* e do gene codificante da ferritina foram obtidos através da síntese *in vivo* e *in vitro* e o siRNA de PDS de arroz, derivado somente de síntese *in vitro*. O gene *pds* codifica a enzima fitoeno desaturase (PDS), uma enzima chave na biossíntese de carotenóides, que protege a clorofila das plantas contra o foto-branqueamento. O silenciamento deste gene mostra um fenótipo visível, claramente demonstrado através do uso de um inibidor químico da síntese desta enzima. No presente estudo, plantas de arroz e de *N. benthamiana* inoculadas com dsRNAs derivados do gene *pds* não apresentaram mudanças fenotípicas. Para avaliação de um outro método foi adaptado um vetor de silenciamento estável, no qual foram inseridos fragmentos de cDNA nas orientações senso e antisenso do gene de ferritina de arroz. O papel da ferritina, segundo experimentação *in vitro*, pode estar ligada à tolerância de certos cultivares de arroz às altas concentrações de ferro. O aprimoramento das metodologias de silenciamento e de transformação poderá resultar em uma ferramenta mais útil para a análise funcional em larga escala de genes de arroz.

^{1/}Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (p.78) – Março, 2006.

EVALUATION OF GENE SILENCING IN PLANTS BY STRATEGIES BASED ON dsRNAs¹

Author: Sandra Maria de Souza
Adviser: Marcelo Gravina de Moraes

ABSTRACT

Gene silencing has been used extensively to facilitate the investigation of different events in plant biology. It can be induced through different ways. The key step for its occurrence is the presence of double strand RNA (dsRNA). In order to evaluate a fast method to obtain silencing for functional analysis in a wide scale, either dsRNAs or siRNAs were directly inoculated in the leaves of rice and *N. benthamiana* plants. The dsRNAs the sequences of the *pds* gene and of the coding region of the ferritin gene were obtained through *in vivo* or *in vitro* synthesis, the siRNA PDS of rice were derived from synthesis *in vitro*. The *pds* gene codifies for the enzyme phytoene desaturase (PDS), a key enzyme in the biosynthesis of carotenoids, which protects the chlorophyll from the plants against photo-bleaching. The silencing of this gene shows a visible phenotype, clearly demonstrated through a chemical inhibition of PDS synthesis. However, no phenotypical changes were observed in either rice or *N. benthamiana* plants inoculated with dsRNA of the *pds* gene. In the present study, it was also adapted a vector for stable transformation, in which were inserted cDNA fragments of both, sense and antisense, orientations of the rice ferritin gene. *In vitro* experiments show that ferritin could be connected to the tolerance to high concentrations of iron of certain cultivars of rice. The improvement of silencing and transformation methodologies could result in a more useful tool for the functional analysis of rice genes in a wide scale.

¹Master of Science dissertation in Agronomy Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (p.78) – March, 2006.

SUMÁRIO

Página

1	INTRODUÇÃO.....	1
	CAPÍTULO I	3
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
	2.4.1 Silenciamento induzido	10
	2.4.2 Mecanismo de silenciamento	11
	2.4.3 Silenciamento sistêmico	13
	2.5 Metodologias utilizadas na indução do PTGS	15
	2.5.2 Silenciamento gênico não-viral	17
	2.6 Silenciamento de genes endógenos e exógenos	19
	CAPÍTULO II	20
3	SILENCIAMENTO GÊNICO ATRAVÉS DE INOCULAÇÃO DE dsRNAs DIRETAMENTE EM FOLHAS DE PLANTAS DE <i>Oryza</i> <i>sativa</i> E <i>Nicotiana benthamiana</i>	20
	3.1 . INTRODUÇÃO.....	20
	3.2 MATERIAL E MÉTODOS	24
	3.2.1 Material vegetal	24
	3.2.2 Extração de RNA.....	24
	3.2.3 Amplificação dos cDNAs	25
	3.2.4 Inserção dos cDNAs.....	27
	3.2.5 Transformação de <i>Escherichia coli</i>	29
	3.2.6 Seleção de colônias transformadas	29
	3.2.7 Extração de plasmídeos recombinantes	30
	3.2.8 Reação de seqüenciamento.....	31
	3.2.9 Análise de confirmação das seqüências	32
	3.2.10 Síntese do RNA de fita dupla (dsRNA) <i>in vivo</i>	32
	3.2.11 Síntese do RNA de fita dupla (dsRNA) e RNA de fita simples (ssRNA) <i>in vitro</i>	34
	3.2.13 Inoculação de dsRNA e siRNA	36
	3.2.14 Inibição química da enzima fitoeno desaturase (PDS) em plantas de <i>Oryza sativa</i> e <i>N. benthamiana</i>	37
	3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
	3.3.1 Genes de <i>pds</i> e ferritina	38
	3.3.2 Inserção dos fragmentos do gene de <i>pds</i> e do gene codificante de ferritina em pLITMUS 38i	39
	3.3.3 Síntese de dsRNA de <i>pds</i> e de ferritina de arroz.....	41
	3.3.4 Síntese de siRNA de <i>pds</i> de arroz	45
	3.3.5 Inoculação de dsRNA, ssRNA e siRNA em arroz.....	46

CAPÍTULO III	56
4 ADAPTAÇÃO DE VETORES PARA USO NO SILENCIAMENTO ESTÁVEL DO GENE CODIFICANTE DE FERRITINA	56
4.1 INTRODUÇÃO	56
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	60
4.2.1 Material vegetal	60
4.2.2 Extração de RNA	60
4.2.3 Amplificação dos cDNAs de Ferritina	60
4.2.4 Inserção dos cDNAs	62
4.2.5 Transformação em <i>Escherichia coli</i>	64
4.2.6 Seleção de colônias transformadas	64
4.2.7 Extração de plasmídeos recombinantes	65
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

RELAÇÃO DE TABELAS

CAPÍTULO II

Página

1. Oligonucleotídeos utilizados nas reações de amplificação. Porto Alegre, RS, UFRGS/LFM, 2004.....26
2. Condições das reações de PCR. Porto Alegre, RS, UFRGS/LFM, 2004. ...27

RELAÇÃO DE FIGURAS

CAPÍTULO II

	Página
1. Produtos da amplificação do cDNA de <i>Oryza sativa</i> por RT-PCR. de pds. Porto Alegre, RS, UFRGS/LFM, 2004.....	40
2. Produtos da amplificação de colônias transformadas. Porto Alegre, RS, UFRGS/LFM, 2004.	41
3. Síntese <i>in vitro</i> dos dsRNAs.. Porto Alegre, RS, UFRGS/LFM, 2004.	42
4. Visualização em gel de agarose dos produtos dos dsRNAs de PDS. Porto Alegre, RS, UFRGS/LFM, 2004.	44
5. Visualização em gel de agarose dos produtos dos dsRNAs de PDS. Porto Alegre, RS, UFRGS/LFM, 2004.	44
6. Visualização em gel de agarose dos produtos de dsRNAs de ferritina <i>in vivo</i>	44
7. Visualização em gel de poliacrilamida do produto de siRNA de PDS <i>in vitro</i> . Porto Alegre, RS, UFRGS/LFM, 2004.	46
8. Planta de arroz submetida à inoculação de dsRNA com uso de abrasivo. Porto Alegre, RS, UFRGS/LFM, 2005.....	48
9. Plantas de arroz após inoculação de dsRNA <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> com uso de abrasivos. Porto Alegre, RS, UFRGS/LFM, 2005.	49
10. Plantas de arroz após infiltração de solução contendo dsRNA de PDS <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> . Porto Alegre, RS, UFRGS/LFM, 2005.	50

11. Produtos da amplificação do cDNA de <i>N. benthamiana</i> . Porto Alegre, RS, UFRGS/LFM, 2005.	52
12. Produtos da amplificação de colônias transformadas com PDS de <i>N. benthamiana</i> . Porto Alegre, RS, UFRGS/LFM, 2005.	52
13. Plantas de <i>N. benthamiana</i> após infiltração de solução contendo dsRNA de PDS de <i>N. benthamiana in vitro</i> . Porto Alegre, RS, UFRGS/LFM, 2005.	53
14. Tratamento com o herbicida Clomazone em arroz. Porto Alegre, RS, UFRGS/LFM, 2005.	54
15. Tratamento com o herbicida Clomazone em <i>N. benthamiana</i> . Porto Alegre, RS, UFRGS/LFM, 2005.	54

CAPÍTULO III

1. Vetor de silenciamento pMCG 161 adaptado de (http://www.chromdb.org/)	62
2. Produtos da amplificação do mRNA de <i>Oryza sativa</i> . Porto Alegre, RS, UFRGS/LFM, 2005.	67
3. Figura esquemática da inserção do cDNA do gene codificante de ferritina na orientação senso. Adaptada de (http://www.chromdb.org/plasmids/fig2.jpg)	68
4. Produtos da amplificação de colônias transformadas. Porto Alegre, RS, UFRGS/LFM, 2005	69
5. Produtos da reação de digestão após inserção cDNA na orientação senso. Porto Alegre, RS, UFRGS/LFM, 2005.	69
6. Figura esquemática demonstrando as inserções dos cDNAs na orientação senso e antisense. Adaptada de (http://www.chromdb.org/plasmids/fig2.jpg)	70
7. Produtos da amplificação de colônias transformadas. Porto Alegre, RS, UFRGS/LFM, 2005.	70

1 INTRODUÇÃO

Um grande desafio da era pós-genômica da biologia vegetal tem sido conhecer as funções de todos os genes de uma determinada planta. A seqüência genômica proporciona grande riqueza de informações na predição de produtos gênicos. Entretanto, a função da maioria destes genes permanece desconhecida, como é o caso do arroz (Goff et al., 2002). Deste modo, o seqüenciamento do genoma do arroz ainda fornece pouca informação ao melhoramento genético da cultura.

É importante ressaltar que o arroz é uma das principais fontes de alimento da população brasileira, isto confere à cultura uma grande importância econômica. A garantia de um suprimento adequado de arroz para a alimentação no Brasil é ameaçada por diversos obstáculos, entre eles as perdas causadas por estresses bióticos e abióticos

Para eliminar ou minimizar o problema pode-se fazer uso de técnicas modernas de biologia molecular que vêm contribuindo decisivamente para acelerar o processo de melhoramento de cultivares através da transformação genética com genes de interesse agrônomico.

Os estudos de genômica funcional, que visam determinar a função de genes através de análises *in vivo* por genética direta e ou reversa, fornecem importantes informações sobre as possíveis participações de genes em

processos biológicos. Estes métodos serão responsáveis pela transformação dos dados obtidos a partir do seqüenciamento, em informação para uso no melhoramento genético.

Diversas técnicas têm sido empregadas na análise funcional de genes. As mais utilizadas são aquelas que empregam elementos genéticos móveis como transposons e retrotransposons (Waterhouse e Helliwell, 2002). Embora essas possam relacionar a mutação obtida em um determinado gene a um fenótipo, necessitam de um longo processo de geração de populações, e numerosas plantas para seleção. Já o silenciamento gênico, além de permitir o direcionamento da supressão do gene alvo, não implica necessariamente no uso de plantas transgênicas, o que normalmente também envolve um processo demorado e de baixa eficiência. Por fim, o silenciamento permite a supressão de um único membro ou de toda uma família gênica, permitindo a determinação da função do gene na planta mesmo no caso de redundância de funções. Portanto, o silenciamento pode ser caracterizado como uma ferramenta eficiente e rápida podendo ser empregada em análise de larga escala.

Neste sentido o objetivo deste trabalho é avaliar diferentes estratégias para obtenção de silenciamento gênico em plantas de arroz e *Nicotiana benthamiana*.

CAPÍTULO I

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cultura do arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) é originário da Índia, sendo hoje cultivado em países de clima subtropical e tropical. É uma angiosperma monocotiledônea da família Poaceae, subfamília *Oryzoideae* (Castro et al., 1999). O gênero *Oryza* inclui muitas espécies distribuídas em todos os continentes, as quais abrigam uma grande variedade de hábitos e formas.

O arroz representa uma das espécies cultivadas mais importantes para a humanidade, alimentando aproximadamente metade da população mundial (Maclean et al., 2002). Na América Latina e no Caribe, o arroz é a fonte mais importante de calorias e proteínas para a população (Roca et al., 1996), fornece 20% de energia e 15% das proteínas necessárias ao homem (Azambuja et al., 2004).

O arroz ocupa, entre os cereais, o terceiro maior volume de produção mundial, e o segundo lugar para consumo humano, perdendo apenas para o trigo (Lopes, 2005). A Ásia ocupa a primeira posição em produção e consumo mundiais; a América do Sul, a segunda em produção e a terceira em consumo.

O Brasil é o nono produtor mundial de arroz (Azambuja et al., 2004). O Rio Grande do Sul (RS) é o maior produtor do Brasil, correspondendo a mais da metade da produção nacional (IBGE, 2005), com uma produção de 6 milhões de toneladas na safra 2003/04 (IRGA, 2005).

A produtividade da cultura do arroz no RS tem crescido continuamente ao longo dos anos. O marco significativo deste aumento ocorreu a partir do início da década de 80, com o desenvolvimento da pesquisa, e a conseqüente oferta aos agricultores dos cultivares de porte baixo e de altos rendimentos (Carmona et al., 1994). Entretanto, alguns obstáculos para a manutenção da estabilidade desta produção reside na suscetibilidade dos cultivares atualmente em uso a estresses bióticos e abióticos

Essas características podem ser alcançadas por meio do melhoramento genético de plantas, sendo assim essencial à identificação de genes e a compreensão de suas funções (Tyagi, et al., 2004).

2.2 Genômica estrutural

Diversas ferramentas são utilizadas na genômica estrutural, incluindo grande número de cDNAs completos, seqüências alvos expressas (ESTs), microarranjos de cDNAs, linhas mutagenizadas, marcadores moleculares e mapas físicos e genéticos (Yazaki et al., 2000; Wu et al, 2002). Aproximadamente 300.000 ESTs precederam o seqüenciamento do genoma do arroz fornecendo um perfil quantitativo dos níveis de expressão em tecidos específicos (Xu et al, 2005). Além disso, o arroz possui o menor genoma entre os cereais, com um tamanho estimado de 430 Mb, quando comparado ao

tamanho de genomas significativamente maiores como o de sorgo (750 Mb), milho (3.000 Mb), cevada (5.000 Mb) e trigo (16.000 Mb). Essas informações, juntamente com sua importância como uma das principais espécies cultivadas, fazem do arroz uma excelente planta modelo para a genômica (Izawa & Shimamoto, 1996; Tyagi et al., 2003).

No seqüenciamento do arroz foram utilizados quatro genomas, três referentes ao cultivar Nipponbare do grupo *japonica* (Goff et al., 2002) e um da variedade 93-11, do grupo *indica* (Yu et al., 2002). A disponibilidade da seqüência genômica de dois grupos de arroz fornece um amplo recurso para os estudos de evolução e adaptação (Rensink & Buell, 2004). Claramente, as duas subespécies são altamente conservadas (Feng et al., 2002, Yu et al., 2002) mesmo que sejam adaptadas a climas distintos, (Rensink & Buell, 2004). Estima-se que o arroz apresenta aproximadamente 50.000 genes codificantes de proteínas (Goff et al., 2002; Yu et al., 2002). Os esforços empregados para a descoberta das seqüências dos genes e das regiões intergênicas do genoma do arroz, proporcionarão o entendimento da expressão gênica, replicação do DNA, organização dos cromossomos, recombinação, especialização e evolução (Khush & Brar, 2000).

Outro fator que favorece o emprego do arroz como espécie modelo inclui o fato de que ele pode ser transformado via *Agrobacterium tumefaciens* ou bombardeamento de partículas, tornando-o um fácil alvo de manipulações (Tyagi & Mohanty, 2000). Além disso, o alto grau de sintonia entre os genomas de cereais, faz do arroz um organismo modelo ideal para estudos de fisiologia, biologia molecular, genética, evolução e genômica da família das gramíneas

(Rensink & Buell, 2004). A relação sintênica entre os genomas poderá ser utilizada para o mapeamento de genomas maiores tendo-se o do arroz como modelo (Schimidt, 2000, 2002).

2.3 Genômica funcional

Para compreensão da grande quantidade de dados acumulados em razão dos projetos de seqüenciamento, assim como a compreensão da função de uma célula em nível global, é necessária uma metodologia de análise em larga escala (Tyagi et al., 2004). Hieter & Boguski (1997), descreveram o termo genômica funcional como “o desenvolvimento e aplicação de técnicas experimentais em escala genômica para inferir a função gênica, utilizando informações oriundas da genômica estrutural”.

Muitas metodologias têm sido desenvolvidas para explorar a provável função de genes assim como para monitorar sua expressão em relação a outros genes. Podem ser citadas, por exemplo, a bioinformática (Meagher, 2002), metodologias *in vitro* de análise de mRNA, como técnicas de expressão diferencial e microarranjos de cDNAs, e clonagem baseada em mapas, a qual consiste na análise genética de mutantes e variações nas características genéticas que ocorrem naturalmente (Lukowitz et al., 2000). Outra metodologia, envolve a utilização de mutagênese por inserção de T-DNA ou transposons, além de mutações derivadas de tratamento químico ou físico (Chen et al., 2003). No entanto, essas técnicas de mutação normalmente envolvem um processo longo e trabalhoso, devido o número elevado de

plantas que devem ser mutadas para selecionar o fenótipo desejado (Waterhouse e Helliwell, 2002).

No caso de organismos previamente seqüenciados, como o arroz e *Arabidopsis thaliana*, as técnicas de análise por genética reversa são as estratégias mais simples e diretas para a identificação da função de um determinado gene (Rensink & Buell, 2004). Uma destas técnicas consiste no silenciamento gênico pós-transcrição (PTGS), com o qual é possível o direcionamento da supressão do gene alvo, sendo uma ferramenta eficiente, rápida e específica na detecção da função gênica (Tyagi et al., 2004).

2.4 Silenciamento

Silenciamento em nível de mRNA é um mecanismo regulatório que limita os níveis de transcritos pela ativação de um processo de degradação dependente de homologia entre seqüências (Silenciamento gênico pós-transcrição, PTGS), (Hamilton et al., 2002).

As primeiras observações de PTGS, também chamado Interferência por RNA (RNAi), foram descritas em plantas, as quais durante sua evolução desenvolveram complexos sistemas de regulação gênica que conferem a habilidade de distinguir genes endógenos de outros (Agrawal et al., 2003). Posteriormente, os fenômenos relacionados ao silenciamento gênico foram descritos em um grande número de organismos eucarióticos, incluindo protozoários como: *Trypanosoma brucei*, *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* (Al-Anouti et al., 2003; Cottrell & Doering, 2003; Malhotra et al., 2001), invertebrados: *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* (Brooks &

Isaac, 2002; Hammond et al., 2000), vertebrados: Zebra fish, *Xenopus laevis*, camundongos, humanos (Caplen et al., 2001; Chiu & Rana, 2002; Nakano et al., 2000; Wargelius et al., 1999), fungos: *Neurospora crassa*, *Schizosaccharomyces pombe* (Cogoni et al., 1994; Raponi & Arndt, 2003) e algas: *Chlamydomonas reinhardtii* (Winston et al., 2002).

Estudos genéticos e bioquímicos indicam que os fenômenos observados em diferentes espécies compartilham um mecanismo comum, e que as enzimas envolvidas nesse processo exibem alta similaridade entre as espécies (Stanislawska & Olszewski, 2005). Isso sugere uma origem evolutiva antiga desse fenômeno, a partir de um ancestral comum entre fungos, plantas e animais (Mello e Conte Jr, 2004). A conservação de tal mecanismo entre eucariotos também revela a importância dessa resposta adaptativa para esses organismos, pois protege a área mais sensível das espécies, seu código genético (Stanislawska & Olszewski, 2005).

O silenciamento é um mecanismo que ocorre naturalmente como uma forma de proteger os organismos contra infecções virais (Voinnet, 2001) e elementos móveis de DNA do próprio genoma (Ketting et al., 1999; Wu-Scharf et al., 2000). Além disso, o silenciamento de genes atua no controle dos programas de desenvolvimento de organismos eucarióticos (Agrawal et al., 2003), como descrito por Palatnik et al. (2003) para o desenvolvimento foliar em *A. thaliana*. Em uma análise de mutantes de *A. thaliana*, os autores identificaram o locus JAW, o qual produz um miRNA que pode guiar a clivagem do mRNA de diversos genes *tpc* controlando o desenvolvimento das folhas. A

clivagem do mRNA de TPC4 guiada por micro RNA de interferência (miRNA) é necessária para prevenir a atividade anormal do gene.

Baulcombe, em 2004, relatou a existência de diferentes vias de silenciamento de mRNA. A primeira consiste no silenciamento citoplasmático pelos pequenos RNAs de interferência (siRNAs). Esta via pode ser importante em plantas infectadas por vírus, nas quais a replicação viral produz intermediários de dsRNA ou um RNA fita simples com estrutura secundária formando fitas duplas. No caso de infecções por vírus de DNA, ocorre a formação de dsRNA a partir do anelamento de transcritos com seqüências complementares. A segunda via consiste no silenciamento de mRNAs endógenos, desencadeado por miRNAs. Os miRNAs regulam negativamente a expressão gênica pelo pareamento com mRNAs homólogos, resultando na clivagem do mRNA ou na inibição da tradução. A terceira via de silenciamento em plantas está associada com a metilação do DNA e a supressão da transcrição, a qual pode ser guiada por siRNAs. A primeira evidência desse tipo de silenciamento foi relatada em plantas, nas quais a metilação do DNA foi guiada por RNA viral contra seqüências específicas de nucleotídeos (Jones et al, 2001). Recentemente, tem-se observado que além de direcionarem a metilação de DNA em plantas, os siRNAs estão ligados a modificações nas histonas (Zilberman, 2003). Um importante papel do silenciamento em nível de cromatina é provavelmente a proteção do genoma contra danos causados por transposons (Baulcombe, 2004).

Ao longo de sua evolução, as plantas conservaram a capacidade de realizar os três tipos de silenciamento. No entanto, outros organismos podem

ter perdido uma ou mais vias de silenciamento. Nos animais, por exemplo, a única via de silenciamento natural envolve miRNAs (Bartel, 2004). Entretanto, as diversas vias de silenciamento de mRNA não podem ser vistas como totalmente independentes, pois algumas proteínas desempenham papéis em mais de uma via.

2.4.1 Silenciamento induzido

O silenciamento foi observado pela primeira vez em plantas, quando Napoli et al. (1990), tentavam super-expressar o gene codificante da chalcona sintase, enzima envolvida na pigmentação em petúnias. No entanto, algumas das plantas transformadas apresentaram perda na coloração das flores. Análises da acumulação de mRNA de chalcona sintase em petúnias, revelaram que o nível de transcritos era baixo, mostrando ter havido perda na atividade tanto do gene endógeno quanto do transgene, motivo pelo qual o fenômeno foi denominado co-supressão (Lecellier & Voinnet, 2004).

Em 1998, Fire et al. verificaram que a aplicação de dsRNA era capaz de induzir um mecanismo de degradação de mRNA altamente específico. Tal processo foi denominado de RNAi. Neste estudo, foi realizada a aplicação direta de dsRNA em *C. elegans* por injeção, a fim de silenciar o gene *unc-22*, o qual codifica uma proteína de miofilamentos, cujo silenciamento provoca contrações musculares.

O maior conhecimento sobre o mecanismo de silenciamento de mRNA estimulou sua utilização como uma ferramenta na genômica funcional. Sua aplicação tem sido estudada extensivamente e aprimorada para facilitar a

investigação de diferentes fenômenos na biologia vegetal (Baulcombe, 2002; Horiguchi, 2004). Muitos termos são usados para descrever o silenciamento de mRNA, incluindo co-supressão, RNAi, PTGS e supressão senso (Baulcombe, 2002).

O estudo do mecanismo do PTGS tem revelado que o mesmo é composto de três etapas: iniciação, propagação e manutenção. Segundo Vaucheret et al. (2001), o início do PTGS exige a presença de dsRNA, o qual pode ser obtido por maneiras distintas. Uma dessas consiste na transformação estável utilizando vetores que expressam dsRNA com repetições invertidas, formando um RNA em forma de grampo (hpRNA) (Miki & Shimamoto, 2004). Outro modo consiste na introdução de transgenes com promotores fortes, pois, segundo Mello & Conte Jr. (2004), um alto nível de expressão do transgene acarreta defeitos no processamento do mRNA, como por exemplo, a falta da cauda de poli-A. O silenciamento pode ainda ser desencadeado por meio de vetores virais contendo um fragmento da seqüência do gene de interesse (Voinnet, 2001). Além desses métodos, Tenllado et al. (2003), utilizaram um lisado bruto de bactérias que expressavam dsRNA para induzir o silenciamento de vírus em plantas de *Nicotiana benthamiana*.

2.4.2 Mecanismo de silenciamento

A etapa chave para a ocorrência de silenciamento é a formação de um dsRNA, o qual pode ser sintetizado intracelularmente, a partir de transcritos anormais, ou codificado por RNA viral (Dalmay et al., 2000; Stanislawska & Olszewski, 2005). Esse dsRNA é reconhecido como estranho ao organismo,

ativando uma enzima denominada “Dicer” ou “semelhante a Dicer” (DCL), em plantas. Essas enzimas são evolutivamente conservadas, sendo encontradas em *C. elegans*, *D. melanogaster*, plantas e mamíferos (Stanislawska & Olszewski, 2005). No entanto, pode haver variação quanto ao número dessas enzimas. Por exemplo, humanos e *C. elegans* apresentam somente uma Dicer, já *A. thaliana* e arroz possuem quatro enzimas “Dicer” (DCL1 a DCL4), com diferentes funções (Lecellier & Voinnet, 2004; Wang & Metzlaff, 2005). A DCL1 está ligada à biogênese de miRNAs; a DCL3 produz siRNAs de elementos transponíveis. Já as funções da DCL2 e da DCL4 não estão claramente definidas (Baulcombe, 2004).

A enzima “Dicer” apresenta cinco domínios característicos: um domínio de helicase; um domínio PAZ, responsável pelo reconhecimento dos siRNAs; dois domínios de RNase III e um domínio de ligação de dsRNA. Os dsRNAs são processados pela “Dicer” em pequenas moléculas de RNA de interferência (siRNAs) de fita dupla com tamanho variando de 21 a 26 nucleotídeos (Miki et al., 2005).

As plantas produzem duas classes de siRNAs: os curtos, formados por 21 a 23 nucleotídeos, ligados a clivagem do mRNA alvo pela RISC, e os longos com 24 a 26 nucleotídeos, ligados ao silenciamento sistêmico (Hamilton et al., 2002; Lecellier & Voinnet, 2004; Wang & Metzlaff, 2005). Essas moléculas possuem extremidades 5' fosforiladas e dois nucleotídeos não pareados em suas extremidades 3' (Novina & Sharp, 2004). Segundo Stanislawska & Olszewski (2005), essas características são essenciais para a atividade dessas moléculas, pois foi demonstrado que siRNAs que possuem as

extremidades cegas se mostram ineficientes nas próximas etapas do processo. Os siRNAs são incorporados em um complexo protéico, o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), o qual deve ser convertido de uma forma latente, contendo um siRNA fita dupla, para uma forma ativa pela separação das fitas por uma helicase.

Em plantas, foi observada a ocorrência de amplificação e deslocamento do sinal de silenciamento. Essa amplificação permite que o sinal de silenciamento seja disseminado para outros tecidos, efeito chamado de supressão sistêmica (Hannon, 2002).

Outras moléculas que podem atuar no silenciamento de genes são os miRNAs, os quais são derivados de dsRNAs em forma de grampo (hpRNA). Esses últimos são transcritos a partir do próprio genoma com complementaridade parcial de seqüência, cujo tamanho pode variar de 20 a 50 pares de base. Os hpRNAs são processados pela enzima “Drosha” no núcleo, formando os miRNAs, os quais são posteriormente exportados para o citoplasma, onde medeiam a repressão da tradução, podendo também guiar a degradação de mRNA (Meister & Tuschli, 2004).

2.4.3 Silenciamento sistêmico

O silenciamento sistêmico consiste na disseminação de um sinal entre as células, sendo observado em nematóides e plantas. Esse processo requer um grupo de enzimas denominado RNA polimerases dependentes de RNA (RdRPs), as quais são responsáveis pela geração e amplificação de sinais de silenciamento, mais especificamente, de siRNAs. Os siRNAs são

utilizados como oligonucleotídeos iniciadores para geração de novos dsRNAs pela RdRP, os quais podem subseqüentemente servir de alvo para a enzima “Dicer” e serem processados em novos siRNAs (Novina & Sharp, 2004; Stanislawska & Olszewski, 2005).

Em plantas, a transmissão do sinal não precisa atravessar muitas membranas, pois as células são conectadas por plasmodesmas. Segundo Hamilton et al. (2002), o silenciamento sistêmico está relacionado com o movimento de siRNAs pertencentes à classe de moléculas com 24 nucleotídeos. Análises deste mecanismo em plantas transgênicas expressando a proteína verde fluorescente (GFP), indicam que a sinalização pode ocorrer a curtas distâncias (10 a 15 células) através dos plasmodesmas, ou a distâncias maiores através do sistema vascular (Stanislawska & Olszewski, 2005).

Vaucheret et al. (2001) verificaram a transmissão sistêmica através da localização do PTGS do gene de nitrato redutase que ocorreu em tecidos localizados acima do ponto de introdução do vetor de silenciamento na planta, sugerindo que existe a propagação do sinal. Os autores observaram que o silenciamento foi transmitido célula a célula com 100% de eficiência em genes com homologia de seqüências. O mesmo não ocorreu em transgênicos com seqüências não homólogas, o que indica que o sinal é transmitido de modo específico (Palauqui et al., 1997). Baulcombe (2002) obteve resultados similares com PTGS em plantas transgênicas expressando GFP. Quando as plantas transformadas foram silenciadas por infiltração de vetores virais carregando fragmento de um gene, o silenciamento era inicialmente localizado, manifestando-se somente em alguns tecidos que perdiam a coloração da

proteína GFP, mas por fim tornou-se sistêmico silenciando a proteína por toda a planta.

Apesar dos siRNAs estarem ligados ao silenciamento sistêmico, é possível que outros RNAs também atuem como moléculas de silenciamento, incluindo longos RNA de fita simples (ssRNA) ou dsRNAs, pois qualquer um desses RNAs pode iniciar o silenciamento quando introduzidos em células. O plasmodesma pode limitar o tamanho das moléculas, podendo ser uma barreira no movimento intercelular de complexos contendo RNA de grande massa molecular, mas é possível que RNAs livres ou complexos de RNAs de pequena massa molecular possam trafegar entre as células (Baulcombe, 2004).

2.5 Metodologias utilizadas na indução do PTGS

Os dois sistemas mais utilizados para indução do silenciamento em plantas são o silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS) em *N. benthamiana*, e transgenes codificando hpRNAs em *A. thaliana* (Waterhouse & Helliwell, 2002). Os métodos de transformação geralmente incluem *A. tumefaciens* (Voinnet et al., 2000; Liu et al., 2002) e bombardeamento de partículas (Miki & Shimamoto, 2004).

2.5.1 Silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS)

Há muito tempo, inoculações de linhagens virais atenuadas são usadas no controle de doenças virais em plantas. Esta forma de “vacinação” é chamada de proteção cruzada, e indica que muitas infecções virais em plantas evitam uma acumulação secundária da linhagem viral similar àquela da

infecção viral primária (Voinnet, 2001). Usando como modelo a infecção do vírus X de batata (PVX), verificou-se que a proteção cruzada é funcionalmente equivalente ao silenciamento de RNA tendo em vista a conservação dos mecanismos moleculares observados em ambos os casos (Ratcliff et al., 1999).

Muitos vírus de plantas têm genoma RNA fita simples. Seu RNA genômico é então replicado, sendo que o vírus codifica sua própria RdRP, resultando na formação de intermediários de dsRNA. Após a replicação viral, o PTGS é acionado contra as seqüências virais.

O silenciamento viral tem sido utilizado na análise funcional de genes em plantas. Este método envolve a infecção de uma planta com o vetor viral contendo um fragmento de seqüência do gene do hospedeiro (Ruiz et al., 1998). Geralmente, são utilizados fragmentos de 300 a 800 pb da seqüência do gene alvo na construção dos vetores, porém existem relatos que indicam que seqüências de 23 a 60 nucleotídeos podem ser efetivas (Waterhouse & Helliwell, 2002). A planta que sofre infecção apresenta o gene alvo silenciado e o papel biológico do mesmo indicado pelo fenótipo produzido. Desta forma, o VIGS representa um método rápido para associar funções às seqüências de genes que ainda não foram caracterizados.

Segundo Waterhouse & Helliwell (2002), o sistema VIGS é útil em plantas que são difíceis de transformar e também para análises de genes em larga escala, pois vetores virais podem ser aplicados por simples inoculação por abrasivos. Entretanto, muitos vírus utilizados para VIGS têm um número limitado de hospedeiros, e a compatibilidade vírus-hospedeiro é um fator crucial

para a eficiência do silenciamento. Uma outra limitação é o alto custo de produção dos vetores *in vitro*. Esse problema pode ser evitado pela utilização de vetores virais em *A. tumefaciens*, a qual pode ser infiltrada em folhas por injeção, em determinadas espécies (Waterhouse & Helliwell, 2002).

Burton et al. (2000), confirmaram a função de um gene sintase celulose de *Nicotiana tabacum* utilizando o vírus PVX. Diversos vírus, dentre os quais, TMV (Tobacco mosaic virus) (Kumagai et al., 1995), PVX (*Potato virus X*) (Ruiz et al., 1998 e Dalmay et al., 2000) e TGMV (Tomato golden-mosaic-virus) (Kjemtrup et al., 1998), TRV (Tobacco rattle virus) (Liu et al. 2002) foram desenvolvidos como vetores de VIGS. Voinnet (2001) apresenta uma revisão de vírus utilizados para o sistema VIGS em plantas.

2.5.2 Silenciamento gênico não-viral

Baseado no mecanismo de silenciamento viral, no qual ocorre a formação de dsRNA, foram desenvolvidos diversos sistemas para silenciar genes específicos com maior eficiência através de transformação genética (Wesley et al., 2001).

Para silenciar genes de interesse têm sido utilizadas construções com seqüências de DNA com repetições invertidas complementares com capacidade de produzir dsRNA, através da formação de transcritos com uma estrutura de RNA na forma de grampo (hpRNA). Esse tipo de vetor pode ser utilizado em transformações estáveis por *A. tumefaciens* (Waterhouse, 2001). Uma seqüência interveniente de DNA entre as seqüências invertidas complementares não afeta a especificidade do silenciamento, podendo chegar a 100% de silenciamento do gene (Waterhouse, 2001).

Um exemplo foi relatado em *A. thaliana* e *Lycopersicon esculentum* (tomate). Tais plantas foram transformadas com uma construção desenhada para gerar alta complementaridade aos transcritos *iaaM* e *ipt*, oncogenes da agrobactéria, que provocam o crescimento da galha em plantas infectadas, fazendo com que haja a formação de hpRNAs. As plantas transgênicas retiveram a suscetibilidade para a transformação, mas foram altamente refratárias à formação de tumores, devido à degradação dos transcritos de *iaaM* e *ipt* da agrobactéria (Escobar et al., 2001).

Klahre et al. (2002), utilizaram o bombardeamento de partículas para induzir silenciamento da proteína GFP em *N. tabacum*, através da introdução de siRNAs. O silenciamento foi detectado 3 a 4 dias após o bombardeamento e tornou-se sistêmico 2 semanas após a manifestação no tecido vascular. A introdução de siRNAs também é constantemente utilizada para indução de silenciamento em *D. melanogaster* e linhagens celulares humanas. O bombardeamento de partículas também pode ser utilizado para introdução de moléculas maiores, como vetores que codificam dsRNAs (Miki & Shimamoto, 2004) ou hpRNAs (Azevedo et al, 2002).

Outro método desenvolvido por Tenllado et al. (2003) envolve o emprego de um sistema de produção de dsRNA *in vivo*, através da utilização de uma bactéria capaz de produzir grande quantidade de dsRNA, sem degradá-lo. Os autores promoveram silenciamento dos vírus *Pepper mild mottle vírus* (PMMoV) e *Plum pox vírus* (PPV) em plantas de *N. benthamiana* pela pulverização de lisados de bactérias que produziam dsRNAs sobre as plantas. As plantas se mostraram imunes à infecção viral por 7 dias.

O silenciamento gênico também foi realizado em *Ceratopteris richardii*, uma samambaia aquática que tem sido utilizada para investigar o processo de desenvolvimento dependente de luz e de gravidade (Murata & Sugai, 2000). Pela simples incubação em meio de germinação contendo dsRNA, esporos de *C. richardii* germinaram exibindo silenciamento de muitos genes testados (Stout et al., 2003).

2.6 Silenciamento de genes endógenos e exógenos

Desde as primeiras observações, o silenciamento envolve genes que promovem modificações fenotípicas capazes de serem facilmente identificadas. Isso ocorreu, por exemplo, no caso do silenciamento da enzima chalcona sintase em petúnias (Napoli et al., 1990), citado anteriormente.

O gene *pds*, o qual codifica a enzima fitoeno desaturase, é ideal para demonstrar a eficiência do silenciamento (Benedito et al., 2004). Essa enzima participa na via de biossíntese de carotenóides e seu silenciamento leva a redução nos níveis desses pigmentos, resultando na perda da coloração das folhas (Liu et al., 2002; Benedito et al., 2004).

Vetores contendo GFP têm sido usados para demonstrar o silenciamento em plantas transgênicas e, juntamente com a β -Glucuronidase (GUS), são considerados ideais para estudos da supressão desse mecanismo (Benedito et al., 2004). A expressão de GFP pode ser visualizada sob luz UV, na forma de fluorescência verde. Miki & Shimamoto (2004) construíram vetores de silenciamento cujo alvo era a proteína GFP de arroz transgênico por meio de bombardeamento de partículas.

CAPÍTULO II

3 SILENCIAMENTO GÊNICO ATRAVÉS DE INOCULAÇÃO DE dsRNAs DIRETAMENTE EM FOLHAS DE PLANTAS DE *Oryza sativa* E *Nicotiana benthamiana*

3.1. INTRODUÇÃO

Um dos mais importantes avanços da biologia celular foi à descoberta que moléculas de RNA podem regular a expressão de genes. Por muitos anos, tinha-se a idéia de que os RNAs cumpriam apenas duas funções nas células: como mRNAs, que são intermediários vitais na expressão de genes, transmitindo informações entre DNA e proteína, e como tRNAs e rRNAs, os quais têm papéis na estrutura, no processo catalítico e como decodificadores de informações na síntese de proteínas. No entanto, essa visão mudou em 1998, quando Fire et al. anunciaram suas descobertas sobre a interferência por RNA (RNAi) em nematóides. Esse processo consiste no silenciamento da expressão de genes por moléculas de RNA de fita dupla (dsRNA). A partir desse momento, tornou-se claro que o silenciamento é uma ferramenta experimental muito útil na descoberta da função de genes (Novina & Sharp, 2004).

Inicialmente, considerava-se que dsRNAs silenciavam genes pela marcação de seus mRNAs para destruição. Mas, pelo menos dois outros mecanismos foram descobertos: bloqueio da transcrição e a inibição da tradução.

O conhecimento do mecanismo de silenciamento de mRNA estimulou sua utilização como uma ferramenta na genômica funcional. Sua aplicação tem sido estudada extensivamente e aprimorada para facilitar a investigação de diferentes fenômenos na biologia vegetal (Baulcombe, 2002; Horiguchi, 2004).

Uma forma de aplicação do silenciamento seria através da utilização de vetores que expressam dsRNA com repetições invertidas, formando um hpRNA (Vaucheret et al., 2001). Vetores que codificam hpRNAs podem ser utilizados para transformação estável ou transitória. Miki & Shimamoto (2004) testaram o mesmo vetor em diferentes sistemas em arroz. Através da transformação estável por *A. tumefaciens* os autores obtiveram silenciamento da família de genes OsRac, com o uso de uma construção única, contendo regiões conservadas de um único membro da família. Já, por meio de transformação transitória por bombardeamento de partículas, os mesmos autores silenciaram a proteína GFP em plantas de arroz transformadas.

Outro método de silenciamento em plantas, o silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS), é desencadeado pela formação de intermediários de dsRNA durante a replicação viral. Diversos estudos vêm sendo realizados com a utilização desse sistema, o qual mostra ser um poderoso método para verificação da função de genes em plantas (Benedito et al., 2004). O VIGS

envolve a infecção de uma planta com o vetor viral carregando um fragmento de seqüência do gene do hospedeiro.

Holzberg et al. (2002) descreveram a utilização de VIGS pela primeira vez em cevada. Neste trabalho foi descrito o silenciamento do gene *pds* com o uso do *Barley stripe mosaic virus* (BSMV), o qual infecta muitas espécies de monocotiledôneas de importância agrícola. O vetor viral foi inoculado por infiltração em folhas de cevada.

Em 1998, Fire et al. verificaram que a aplicação de RNA fita dupla (dsRNA) era capaz de induzir um mecanismo de degradação de mRNA altamente específico. Tal processo foi denominado de interferência por RNA (RNAi).

O completo seqüenciamento do genoma de *C. elegans*, em 1998, juntamente com o advento das técnicas de RNAi para inibir a função gênica, levou a uma nova era no campo da genômica funcional. Existem diferentes métodos para aplicação de dsRNA em *C. elegans*: (1) injeção de dsRNA em qualquer região do animal (Fire et al., 1998); (2) alimentação com bactérias que produzem dsRNA (Timmons et al., 2001); e (3) embebedimento dos animais em uma solução contendo dsRNA (Tabara et al., 1998).

A utilização de dsRNA diretamente na superfície foliar de plantas foi descrita por Tenllado et al. (2003), no qual empregaram um sistema de produção de dsRNA *in vivo* pela utilização de uma bactéria capaz de produzir grande quantidade de dsRNA, sem degradá-lo. Os autores promoveram uma interferência específica contra infecções virais com o uso de dsRNAs purificados, aplicados por inoculação mecânica e, ainda, pela pulverização de

extratos brutos de lisados bacterianos em folhas de *N. benthamiana*. Em outro trabalho, Stout et al., (2003) obtiveram o silenciamento em *Ceratopteris richardii*, uma samambaia aquática. O silenciamento gênico foi obtido pela simples incubação em meio de germinação contendo dsRNA.

Por fim, existe um método de indução de silenciamento que vem sendo utilizado em mamíferos, o qual consiste na aplicação de siRNAs nas espécies estudadas (Elbashir et al., 2001; Dykxhoorn et al., 2003). A utilização desse sistema em células de mamíferos foi importante, pois permitiu a prevenção do desencadeamento de uma resposta por interferons, que resulta na degradação não específica de mRNAs e na inibição da tradução (Dykxhoorn et al., 2003). Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar diferentes estratégias de inoculação direta de dsRNAs para uso no silenciamento de genes em plantas de arroz e *N. benthamiana*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Material vegetal

Sementes de *Oryza sativa* dos cultivares EPAGRI 108 (tolerante a altas concentrações de ferro), e BR IRGA 409 (sensível a altas concentrações de ferro) foram cedidas pelo Instituto Rio-grandense do Arroz (IRGA). As mesmas foram cultivadas em câmara de crescimento no escuro sob temperatura controlada de 28 °C. Após a germinação, as plântulas foram transferidas para copos de plástico contendo substrato e colocadas em casa de vegetação com fotoperíodo de 12 h.

Sementes de *Nicotiana benthamiana* foram cedidas pela Universal Leaf Tabacos do Brasil. As mesmas foram colocadas em copos plásticos contendo substrato e mantidas em casa de vegetação com fotoperíodo de 12 h.

3.2.2 Extração de RNA

Folhas das plantas de arroz e *N. benthamiana* foram utilizadas para a extração de RNA total, segundo método descrito por Bugos et al. (1995). O tecido foi triturado em nitrogênio líquido, transferindo-se para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL aproximadamente 100 mg de material vegetal. Acrescentaram-se 400 µL de tampão de extração de RNA (100 mM de Tris-HCl pH 9,0, 200 mM NaCl, 15 mM EDTA, 0,5% de dodecil sulfato de sódio-SDS), 2,3 µL de 2-mercaptoetanol, 400 µL de fenol e 80 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v:v). Após homogeneização por vigorosa agitação, foram

acrescentados 28 μL de acetato de sódio 3 M (pH 5,2), seguindo-se incubação no gelo por 15 min. Em seguida, o material foi centrifugado a 16.000 x g durante 10 min (4 °C). A fase superior foi utilizada para extração com 400 μL de fenol e 80 μL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v:v). O material foi agitado vigorosamente por 2 min e centrifugado a 16.000 x g por 5 min (4 °C). A fase superior foi separada e os ácidos nucleicos foram precipitados utilizando isopropanol (1:1, v:v) durante 1 h, a - 20 °C, e em seguida centrifugados a 10.000 x g por 10 min, a 4 °C. A fase superior foi descartada e ao precipitado foi adicionado com 500 μL de etanol 70%, seguido de centrifugação a 10.000 x g por 5 min, a 4 °C. O precipitado foi solubilizado em água ultra pura e centrifugado a 10.000 x g por 5 min a 4°C, com transferência da fase superior para novo tubo. A precipitação seletiva de RNA foi realizada utilizando 37,5 μL de cloreto de lítio 3 M a 4°C por 12 h, seguida de centrifugação a 10.000 x g por 10 min (4°C). O material precipitado foi lavado com 500 μL de etanol 70%, e solubilizado em água ultra pura. A concentração das amostras foi estimada por leitura em espectrofotômetro (Smart Spect™ Bio-Rad) a 260 nm. A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose 1% e o mesmo foi armazenado a -20 C.

3.2.3 Amplificação dos cDNAs

O RNA total de plantas de arroz foi submetido à técnica de transcrição reversa acoplada à reação em cadeia da polimerase (RT-PCR),

com a utilização dos oligonucleotídeos iniciadores Ferr-F e Ferr-R, para ferritina; PDS-F e PDS-R, para fitoeno desaturase (PDS) de arroz; e PDSNb-F e PDSNb-R, para PDS de *N. benthamiana*. As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores foram definidas a partir das seqüências de arroz (XM - 470568, PDS e AF - 519571 e AF - 519570, ferritina) e *N. benthamiana* (AJ - 571700) depositadas no GenBank. As seqüências dos oligonucleotídeos se encontram descritas na Tabela 1.

TABELA 1. Oligonucleotídeos utilizados nas reações de amplificação. Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram baseados na comparação nas seqüências de arroz (AF-519571 e AF-519570, ferritina e XM-470568, PDS) e de *N. benthamiana* (AJ-571700) depositadas no GenBank. Porto Alegre, RS, UFRGS/LFM, 2004.

Nome dos oligonucleotídeos	Seqüências (20nt)
Ferr-F	5' – ATG CTA TGG AGT TGG CCT TG – 3'
Ferr-R	5' – TGG ATG GAA GAA ACG AAA CC – 3'
PDS-F	5' – TGC AAT GGA AGG AAC ACT CC – 3'
PDS-R	5' – ACA TAA GCT TGG CCA CCA AC – 3'
PDS-NbFOR	5' – CAT GCC GAT TGT GGA ACA TA – 3'
PDS-Nb REV	5' – GAG TGG CAA ACA CAA AAG CA – 3'

Primeiramente, foi realizado um processo de transcrição reversa (RT) na reação composta de 500 ng de RNA total, 320 µM de dNTP, 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 3 mM de MgCl₂, 6,6 mM ditioneitol (DTT), 1,32 µM de oligonucleotídeo iniciador antisense (Ferr-R, PDS-R ou PDS-Nb REV) e 6,4 U de enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen), sendo incubada a 37 °C por 1 h. Seguindo o procedimento, foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) no termociclador PTC-100™ (MJ Research), contendo a reação de RT (5 µL), 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 25 mM KCl, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Invitrogen), 1 U da enzima

Taq DNA polimerase (Invitrogen). O volume total das amostras foi de 25 μ L. As condições da PCR para amplificação de cada cDNA estão descritas na Tabela 2.

TABELA 2. Condições das reações de PCR. Porto Alegre, RS, UFRGS/LFM, 2004.

Oligonucleotídeos iniciadores	Desnaturação inicial	Nº de ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final
Ferr-F/R	94 °C (3 min)	35	94 °C (30 s)	60 °C (30 s)	72 °C (2 min)	72 °C (5 min)
PDS-F/R	94 °C (3 min)	35	94 °C (30 s)	50 °C (30 s)	72 °C (2 min)	72 °C (5 min)
PDSNb-F/R	94 °C (3 min)	30	94 °C (2 min)	45 °C (30 s)	72 °C (1 min)	72 °C (5 min)

Os produtos das reações foram visualizados através da separação por eletroforese em gel de agarose 2% contendo tampão TBE (45 mM Tris-HCl, pH 8,3; 45 mM de ácido bórico; 1 mM de EDTA), seguida da coloração em brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Um padrão de DNA (1kb DNA Ladder Invitrogen) foi utilizado em cada gel. Os géis foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados através do sistema de fotodocumentação computadorizado EDAS 120 (Kodak Sciences 2d).

3.2.4 Inserção dos cDNAs

Os produtos das reações de RT-PCR utilizados na clonagem foram previamente tratados com a enzima DNA polimerase Klenow (Fragmento maior da DNA polimerase I) (Promega). A reação (30 μ L) foi composta de 200ng de cDNA, tampão (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl), 0,02 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Invitrogen) e 0,5 U de enzima DNA polimerase Klenow, sendo incubada por 20 min no gelo. O produto da reação

foi purificado pela adição de 10% de acetato de amônio 7,5 M e 2,5 x o volume de etanol 100%. O material foi homogeneizado e precipitado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 h, seguido de centrifugação a 16.000 x g por 20 min ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$). A fase superior foi descartada e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70%, sendo centrifugado a 16.000 x g por 5 min e ressuspenso em água ultra pura. A concentração dos cDNAs foi estimada por visualização em gel de agarose 2% com a utilização de marcador de peso molecular λ Hind III (Promega), .

Os cDNAs tratados com a enzima DNA polimerase Klenow foram inseridos no vetor de clonagem pLITMUS 38i (New England Biolabs). O qual foi previamente digerido em uma reação com volume final de $15\text{ }\mu\text{L}$ contendo $15\text{ }\mu\text{g}$ do vetor, tampão (6 mM Tris-HCl, pH 7,9, 0,15 M NaCl, 6 mM MgCl_2 , 1 mM DTT) e 15 U de *Eco RV*, sendo incubada por 2 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Logo após, o vetor foi desfosforilado pela adição na reação de digestão de 0,12 U da enzima fosfatase alcalina (Promega) e tampão de reação (1 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,1 mM EDTA, pH 7,5, 20 mM NaCl, 0,5% SDS). A reação foi incubada por 15 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, seguida de 15 min a $56\text{ }^{\circ}\text{C}$, processo que foi repetido após nova adição de 0,12 U de enzima fosfatase alcalina. O vetor foi purificado como descrito anteriormente. A concentração de vetor e dos cDNAs foram estimadas em gel de agarose 2% com a utilização da fotodocumentação computadorizado EDAS 120 (Kodak Sciences 2d), utilizando o marcador de peso molecular λ Hind III (Promega)..

A reação de ligação ($20\text{ }\mu\text{L}$) foi composta de 30 ng do cDNA de ferritina, ou 50 ng do cDNA de arroz e de *N.benthamiana*, amplificados através de PCR. Seguido de 100 ng do vetor pLITMUS 38i, 1 U de T4 DNA Ligase e

tampão de ligação (50 mM de Tris-HCl, pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM ATP, 25% polietilenoglicol 8000). A reação foi incubada durante 18 h a 14 °C.

3.2.5 Transformação de *Escherichia coli*

Células eletrocompetentes de *E. coli* XL1-Blue e HT115 (DE3) foram preparadas segundo manual Micro Pulser™ (Bio-Rad), conforme instruções do fabricante. As reações de ligação (100 ng) foram misturadas com 40 µL de células eletrocompetentes e transformadas por eletroporação (Micro Pulser™ Bio-Rad), em cubetas de 0,1 cm, em uma voltagem de 1,8 kV. Em seguida, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio líquido Luria-Bertani (LB – 1% peptona, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl, pH 7,5) e mantidas a 37 °C a 250 rpm. Após 1 h, 200 µL de células bacterianas foram plaqueadas em meio LB acrescido de ampicilina (50 µg.mL⁻¹) e tetraciclina (12,5 µg.mL⁻¹), além de 1,6 mg de X-Gal e 0,8 mg de isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) para células de *E. coli* XL1-Blue.

3.2.6 Seleção de colônias transformadas

A seleção das colônias de *E. coli* XL1-Blue contendo o plasmídeo recombinante (colônias positivas) foi realizada através do sistema de coloração de colônias brancas/azuis. As colônias positivas (brancas) de *Escherichia coli* XL 1-Blue, foram repicadas para placas contendo meio LB acrescido de ampicilina (50 µg.mL⁻¹) e tetraciclina (12,5 µg.mL⁻²) para a confirmação da transformação e obtenção de maior quantidade de material bacteriano.

Nas transformações de PDS e ferritina de arroz, e PDS de *N. benthamiana* as colônias obtidas foram submetidas a PCR com oligonucleotídeos PUC/M13 FOR (5'– CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC–3') e REV (5'–TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C–3') para confirmação da inserção dos fragmentos de cDNA, foi realizada uma PCR (25 μ L) contendo 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (Invitrogen), 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 25 mM KCl, 2,0 mM MgCl₂, 0,4 μ M de cada oligonucleotídeo e parte de cada colônia de bactéria transformada, coletada com a utilização de uma ponteira. A PCR foi realizada no termociclador PTC-100™ (MJ Research), nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 10 min; 30 ciclos constituídos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 65 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 1 min, seguido de uma extensão final a 72 °C por 10 min. Os produtos da reação foram visualizados através da eletroforese em gel de agarose 2% contendo tampão TBE, seguida da coloração em brometo de etídio (0,5 μ g.mL⁻¹). Um padrão de DNA (1kb DNA Ladder Invitrogen) foi incluído em cada gel. O gel foi fotografado como descrito anteriormente.

3.2.7 Extração de plasmídeos recombinantes

A extração de plasmídeos foi baseada na técnica descrita por Brasileiro & Carneiro (1998). Três colônias foram transferidas para 3 mL de meio LB líquido com adição de ampicilina (50 μ g.mL⁻¹) e tetraciclina (12,5 μ g.mL⁻¹), sob agitação (250 rpm) em torno de 16 h, a 37 °C. As células foram

coletadas por centrifugação a 4.000 x g durante 5 min, a 4 °C. Em seguida, foram ressuspensas em 200 µL de solução P1 (RNase 100 µg.mL⁻¹; Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM), seguida de adição de 200 µL da solução P2 (NaOH 200 mM; SDS 1%), invertendo o tubo para completa homogeneização. Após, foi adicionado 200 µL da solução P3 (acetato de potássio 3 M, pH 5,5), invertendo o tubo para a homogeneização, seguida de centrifugação a 16.000 x g por 10 min. A fase superior foi transferida para novo tubo e foram realizadas duas extrações pela adição de aproximadamente 500 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v:v) e agitação, seguida de centrifugação 16.000 x g por 2 min. Para a precipitação do material, utilizou-se aproximadamente 500 µL volume de isopropanol e 10% de acetato de sódio 3 M, pH 5,2, durante 2 h a -20 °C e centrifugação a 16.000 x g durante 15 min a 4 °C. O material precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70%, centrifugado a 16.000 x g por 5 min (4 °C) e ressuspensão em 30 µL de água ultra pura. A estimativa da concentração do material foi realizada em espectrofotômetro (Smart Spec™ Bio-Rad) a 260 nm.

3.2.8 Reação de seqüenciamento

O seqüenciamento foi realizado no Laboratório de Biologia Genômica e Molecular da PUC/RS (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul), através do sistema “DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing kit for MegaBACE DNA Analysis Systems” no sequenciador automático “MegaBACE” (Amersham Biosciences), utilizando 100 ng do

produto de PCR e 2,5 mM do oligonucleotídeo iniciador pUC/M13 Antisenso (5'- TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C -3') e seguindo as instruções do fornecedor.

3.2.9 Análise de confirmação das seqüências

Os eletroferogramas obtidos do seqüenciamento foram analisados através do programa Chromas Lite (Technelysium Pty Ltd). Após foi realizada a comparação das seqüências obtidas com as seqüências de nucleotídeos através do programa BLAST, alinhando duas seqüências (BL2seq) e proteínas (Blastx) depositadas no GenBank: National Center of Biology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA), [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> (Altschul et al., 1997)].

3.2.10 Síntese do RNA de fita dupla (dsRNA) *in vivo*

A síntese de dsRNA foi realizada segundo método descrito por Tenllado et al. (2003). Inicialmente, plasmídeos recombinantes foram extraídos de *E. coli* XL1-Blue, como descrito anteriormente, e utilizados para transformação em células eletrocompetentes de *E. coli* HT115 (DE3). Uma colônia de *E. coli* HT115 (DE3) contendo o plasmídeo recombinante foi adicionada a 2 mL de meio líquido LB acrescido de ampicilina ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e tetraciclina ($12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) sob agitação (250 rpm) a 37 °C. Após aproximadamente 16 h, 500 μL do meio LB contendo as células bacterianas foram adicionadas a 25 mL de meio líquido LB, com os antibióticos citados

anteriormente, sob agitação (250 rpm) a 37 °C, até atingir uma concentração de 7×10^8 células.mL estimada pelo índice de turbidez por espectrofotometria. A seguir, as bactérias foram induzidas à produção de dsRNA através da adição de 0,4 mM de IPTG e incubadas a 37 °C sob agitação de 250 rpm por 3 h.

Após indução à produção de dsRNA, foi realizada uma extração de ácidos nucleicos totais das bactérias, conforme descrito por Timmons et al. (2001). As células foram coletadas por centrifugação a 1.500 x g por 10 min (4 °C) e ressuspensas em 800 µL de solução de extração (acetato de amônio 1 M, EDTA 10 mM) e igual volume de fenol:clorofórmio (1:1; v:v) a 65 °C, seguido de vigorosa agitação por 1 min. O material foi transferido para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL e centrifugado a 18.000 x g por 10 min (4 °C). A fase superior foi transferida para novo tubo, adicionando-se 2,5 x o volume de etanol absoluto para precipitação do material durante 1 h a - 70 °C, seguida de centrifugação a 16.000 x g por 20 min (4 °C). A fase superior foi descartada e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70%. Foi realizada nova centrifugação a 16.000 x g por 5 min (4 °C), e o material foi ressuspenso em solução de diluição (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM). O dsRNA foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose 1%, seguida da coloração em brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Um padrão de DNA (1kb DNA Ladder Invitrogen) foi incluído em cada gel, os quais foram fotografados como descrito anteriormente.

A presença de fita dupla do material foi confirmada através de incubação com RNase A, a qual degrada RNA fita simples (ssRNA). A reação

(10 μL) foi composta de 36 ng de RNA, 0,1 μg de enzima RNase A e 1 μL de acetato de amônio 7,5 M, com incubação a 37 °C por 1 h. Os produtos da reação foram visualizados através da eletroforese em gel de agarose 2%, seguida da coloração em brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Um padrão de DNA (1kb DNA Ladder Invitrogen) foi incluído em cada gel, os quais foram fotografados como descrito anteriormente.

3.2.11 Síntese do RNA de fita dupla (dsRNA) e RNA de fita simples (ssRNA) *in vitro*

A síntese de dsRNA *in vitro* foi realizada a partir de produtos de PCR com oligonucleotídeos iniciadores PUC/M13. A reação foi realizada em volume final de 100 μL , contendo 0,5 μg de cDNA, 120 U de enzima RNA Polimerase T7, tampão de reação (40 mM Tris-HCl, 6 mM MgCl_2 , 2 mM espermidina, 10 mM DTT, pH 7,9), 0,4 mM de cada NTP (ATP, UTP, CTP, GTP) (Invitrogen), seguida de incubação a 37 °C por 3 h.

Para síntese de ssRNA, plasmídeos recombinantes foram amplificados com oligonucleotídeos PUC/M13. A reação de digestão (30 μL) foi composta por 30 μg de plasmídeo recombinante, tampão (6 mM Tris-HCl, pH 7,9, 0,15 M NaCl, 6 mM MgCl_2 , 1 mM DTT), 30 U de enzima Sal I (Promega), para eliminar um dos promotores T7, seguida de incubação a 37 °C por 2 h, e a 60 °C por 15 min. O ssRNA foi produzido nas mesmas condições de reação de dsRNA descritas anteriormente.

Os produtos das reações de dsRNA e ssRNA foram verificados por eletroforese em gel de agarose 2%, seguida da coloração em brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$). Um padrão de dsRNA (Invitrogen) foi incluído em cada gel, os quais foram fotografados como descrito anteriormente.

3.2.12 Síntese de pequenos RNAs de interferência (siRNA)

O dsRNA produzido *in vitro* foi purificado conforme instruções de manual da enzima RNA polimerase III (Short Cut™ RNAi Kit) (New England). A purificação de 100 μL de dsRNA produzido *in vitro* foi realizada pela adição de 100 μL de água ultra pura, 100 μL de fenol equilibrado e 100 μL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1; v:v). Foi realizada vigorosa agitação por 1 min, seguida de centrifugação a 16.000 x g por 10 min. O líquido sobrenadante foi transferido para novo tubo, adicionando-se 2 x o volume da reação inicial de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1; v:v), seguido de vigorosa agitação por 1 min e centrifugação a 16.000 x g por 10 min a 4 °C. O líquido sobrenadante foi transferido para novo tubo, acrescentando-se 10% de acetato de amônio 7,5 M e 2,5 x o volume de etanol 70%. Após homogeneização, o material foi precipitado por 2 h a - 20 °C. A seguir, foi realizada centrifugação a 16.000 x g por 20 min a 4 °C. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70%, invertendo o tubo várias vezes, e ressuspenso em 30 μL de água ultra pura.

A reação de digestão do dsRNA foi realizada conforme kit Short Cut™ RNAi (New England), seguindo instruções do fabricante. A reação (100 μL) foi composta de 1,0 μg de dsRNA purificado, tampão de reação (50 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, pH 7,5), 20 mM MnCl_2 e 1,3 U de enzima RNase III,

seguida de incubação a 37 °C por 20 min. Após esse período, foram adicionados 25 mM EDTA.

Seguindo o procedimento, a reação foi purificada através da adição de 10% de acetato de sódio (3 M, pH 5,2), 20 µg de glicogênio e 3 x o volume de etanol 95%. O material foi homogeneizado e precipitado a – 20 °C por 2 h. Em seguida, foi realizada centrifugação a 18.000 x g por 15 min (4 °C). O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 600 µL de etanol 80%, deixando o material por 10 min em temperatura ambiente. Após, foi realizada nova centrifugação a 18.000 x g por 5 min (4 °C). O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 30 µL de água ultra pura. Os produtos da reação foram visualizados em gel não-desnaturante de poliacrilamida 20% contendo tampão TBE, seguida da coloração em brometo de etídio (0,5 µg.mL⁻¹). O gel foi fotografado como descrito anteriormente.

3.2.13 Inoculação de dsRNA e siRNA

Plantas de arroz (30 e 60 dias de crescimento) e *N. benthamiana* (40 dias de crescimento) foram utilizadas para aplicação de dsRNAs através de dois diferentes métodos: inoculação mecânica, pelo uso de abrasivos; e infiltração com seringa. Foram inoculadas soluções de dsRNA *in vivo* e *in vitro* contendo 3, 4 ou 7 µg em 500µL. O abrasivo (carburundum) foi adicionado às soluções, as quais foram aplicadas com o uso de hastes de madeira com algodão na extremidade embebidos na solução. O mesmo método foi utilizado para aplicação de siRNAs (33 ng.em 100µL) de PDS em plantas de arroz.

A inoculação de dsRNA por infiltração foi realizada em arroz (ferritina e PDS) e *N. benthamiana* (PDS e PDS Nb). As soluções contendo dsRNA foram infiltradas com auxílio de uma seringa estéril sem agulha, na face abaxial das folhas.

Após as inoculações, as plantas foram observadas diariamente por um período de 5 semanas e fotografadas (Nikon Coolpix 4500).

3.2.14 Inibição química da enzima fitoeno desaturase (PDS) em plantas de *Oryza sativa* e *N. benthamiana*

Plantas de arroz com 60 dias e de *N. benthamiana* com 40 dias de crescimento, foram utilizadas para aplicação do agente químico “Gamit 360 CS” (clomazone). Com o uso de algodão envolvido em hastes de madeira, foram aplicadas soluções contendo 3 μ M nas folhas das plantas.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Genes de *pds* e ferritina

No presente trabalho foi utilizado o método de aplicação direta de dsRNA em plantas de arroz. A aplicação direta de dsRNA foi realizada em *C. elegans* por Fire et al., em 1998, e por Timmons et al., em 2001. No caso do estudo realizado por Fire et al. (1998), o dsRNA foi injetado em animais adultos para silenciar o gene *unc-22*, uma proteína de miofilamentos, cujo silenciamento provoca contrações musculares. Já Timmons et al. (2001) submeteram *C. elegans* transformados com a proteína GFP a uma dieta a base de bactérias que produzem dsRNA, causando o silenciamento da proteína. Além destes estudos realizados em *C. elegans*, Tenllado et al. (2003) obtiveram silenciamento de dois vírus, PMMoV e PPV. Os autores utilizaram um extrato de bactérias, acumuladoras de dsRNA, lisadas com prensa francesa e co-inoculadas com os vírus por meio de aspersão sobre folhas de *N. benthamiana*. Este método foi capaz de produzir silenciamento dos vírus por sete dias. Deste modo, foi desenvolvido um método rápido de indução de silenciamento, sem a necessidade da utilização de métodos de transformação estável, os quais implicam também no uso de cultura e regeneração de tecidos. Com base nesses dados de utilização de dsRNA direto nos organismos, neste trabalho foi utilizado o vetor pLITMUS 38i, o qual permite a inserção dos

fragmentos de cDNAs entre dois promotores T7, possibilitando a produção de dsRNA.

A fim de verificar se a aplicação direta de dsRNA causa silenciamento em plantas de arroz, foram realizados experimentos em que o gene *pds* foi utilizado como alvo no silenciamento de RNA. O gene *pds* codifica a enzima fitoeno desaturase e está presente em cópia única no genoma do arroz. Esse gene vem sendo utilizado para análise do silenciamento tanto em monocotiledôneas quanto em dicotiledôneas (Miki et al., 2005). A fitoeno desaturase é uma enzima chave na biossíntese de carotenóides que protege a clorofila das plantas contra o foto-branqueamento (Holzberg et al., 2002). Um outro gene utilizado neste trabalho foi o codificante de ferritina, pois esta proteína pode estar ligada à alta tolerância a ferro reduzido apresentada por determinados cultivares de arroz (Silva et al., 2003). Visando a análise funcional *in vivo* destes genes, foram sintetizados oligonucleotídeos iniciadores específicos para os cDNAs dos genes codificantes de ferritina e da fitoeno desaturase, a partir de seqüências depositadas em banco de genes. Os oligonucleotídeos foram sintetizados de modo a amplificar as duas cópias dos genes codificantes de ferritina presentes no genoma de arroz e uma cópia do gene *pds*.

3.3.2 Inserção dos fragmentos do gene de *pds* e do gene codificante de ferritina em pLITMUS 38i

No sentido de obter os cDNAs de PDS e de ferritina, folhas de plantas de arroz cultivadas em casa de vegetação foram utilizadas para

extração de RNA total, o qual foi submetido a RT-PCR. Foram gerados produtos únicos de 290 pb para ferritina (Fig. 1a) e de 202 pb para PDS (Fig. 1b), conforme o esperado segundo a localização dos oligonucleotídeos iniciadores na seqüência do cDNA.

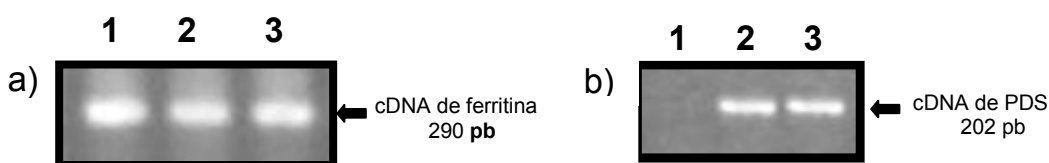


FIGURA 1. Produtos da amplificação do cDNA de *Oryza sativa* por RT-PCR. Géis de agarose demonstrando padrões de amplificação do mRNA de *O. sativa* separados por eletroforese. a) Produtos da reação de RT-PCR, utilizando oligonucleotídeos iniciadores Ferr-F e Ferr-R. 1 a 3 – cDNA de ferritina. b) Produtos da reação de RT-PCR, com oligonucleotídeos iniciadores PDS-F e PDS-R. 1 – Controle negativo; 2 e 3 – cDNA de pds. Porto Alegre, RS, UFRGS/LFM, 2004.

Após reação de polimento das extremidades com a enzima DNA polimerase Klenow, os fragmentos foram ligados no vetor pLITMUS 38i. Os produtos das reações de ligação foram utilizados para transformação de células eletrocompetentes de *E. coli* XL1-Blue. A seleção das colônias foi realizada através do sistema de coloração de colônias brancas/azuis.

Para confirmar que as colônias recombinantes (brancas) possuíam a inserção de interesse, foi realizada uma PCR das mesmas. De 82 colônias brancas, 12 foram analisadas por PCR. Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores PUC/M13 FOR e REV, que além das seqüências de ferritina e PDS, amplificam parte da seqüência do vetor, resultando em fragmentos de 470 pb para PDS e de 560 pb para ferritina (Fig. 2). Todas as colônias analisadas continham a inserção de interesse, tanto para o gene pds quanto para o gene

codificante da ferritina. Por fim, os plasmídeos recombinantes foram seqüenciados confirmando se tratarem de cDNAs de PDS e ferritina.

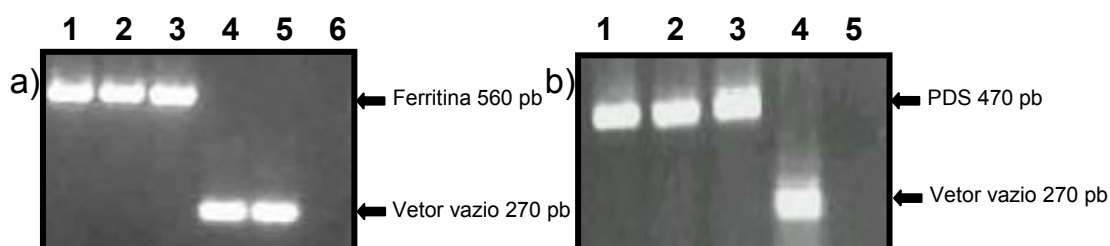


FIGURA 2. Produtos da amplificação de colônias transformadas. Produtos da PCR de colônias de *E. coli* XL1-Blue transformadas com vetor pLITUMUS38i recombinante com fragmentos do gene codificante de ferritina (a) e do gene de *pds* (b), utilizando oligonucleotídeos iniciadores PUC/M13 FOR e PUC/M13 REV. (a) 1 a 3 – amplificação de fragmento do gene codificante de ferritina; 4 – Controle com colônia azul; 5 – Controle vetor vazio; 6 – Controle negativo. b) 1 a 3 – amplificação de fragmento do gene de *pds*; 4 – Controle com colônia azul; 5 – Controle negativo. Porto Alegre, RS, UFRGS/LFM, 2004.

3.3.3 Síntese de dsRNA de *pds* e de ferritina de arroz

Os plasmídeos de colônias recombinantes contendo fragmentos do gene de *pds* ou do gene codificante da ferritina foram utilizados para produção de dsRNA de por meio de síntese *in vitro* pela RNA polimerase T7 (Fig. 3). Além disso, foi realizada a síntese de ssRNA, por meio da digestão dos plasmídeos recombinantes, a fim de eliminar um dos promotores T7. Essas moléculas foram utilizadas para comparação com o dsRNA após as inoculações. As vantagens da produção *in vitro* são a simplicidade e rapidez da reação. No entanto, o alto custo de produção inviabiliza sua utilização para análises em larga escala (Tenllado et al., 2003).

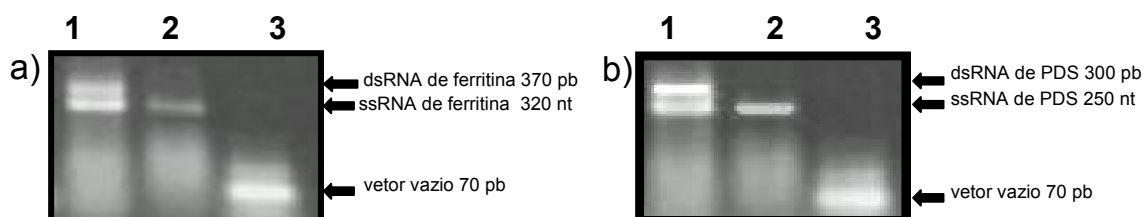


FIGURA 3. Síntese *in vitro* dos dsRNAs. Síntese de dsRNA de ferritina (a) e PDS (b) sintetizado *in vitro* pela enzima RNA Polimerase T7. a) 1 – dsRNA de ferritina (~370 pb); 2 – ssRNA de ferritina (~320 nt); 3 – controle dsRNA sem inserto (~70 pb). b) 1 – dsRNA de PDS (~300 pb); 2 – ssRNA de PDS (~250 nt); 3 – controle dsRNA sem inserto (~70 pb). Porto Alegre, RS, UFRGS/LFM, 2004.

No sentido de minimizar o custo da síntese de dsRNA, os plasmídeos recombinantes foram transformados em células de *E. coli* HT115 (DE3). Timmons et al. (2001) fizeram estudos com algumas linhagens de *E. coli* que possuíam diferentes mutações no gene *rnc*, o qual codifica a RNase III, uma enzima que tem a capacidade de degradar dsRNA. As linhagens utilizadas foram as seguintes: BL21, W3110, SDF204, HT115, DH5 α F, HB101, TG1, SC110, XI1-Blue MRF'. Enquanto a maioria das estirpes utilizadas no estudo sintetizavam quantidades variáveis de dsRNAs de baixo peso molecular, a HT115 (DE3) foi capaz de acumular dsRNAs longos. Isso ocorre devido à deficiência dessa linhagem na atividade da RNase III.

Como a linhagem de *E. coli* HT115 (DE3) se mostrou eficiente na síntese de dsRNAs (Timmons et al., 2001; Tenllado et al., 2003), no presente trabalho essa linhagem foi utilizada para obtenção de dsRNAs. Os dsRNAs foram produzidos, através da adição de IPTG ao meio de crescimento bacteriano, o qual induz a expressão da RNA polimerase T7, possibilitando a transcrição dos fragmentos inseridos entre os promotores T7. Após a indução à produção de dsRNA, foi realizada uma extração de ácidos nucléicos totais, na

qual obteve-se um rendimento de 4,7 μg de ácidos nucléicos totais por mL de cultura, no caso de PDS, e de 4,2 μg de ácidos nucléicos totais por mL de cultura, no caso de ferritina, com base na estimativa por espectrofotômetro. Utilizando o mesmo método de síntese de dsRNA, Tenllado et al. (2003) obtiveram 4 μg de ácidos nucléicos totais por mL de cultura, utilizando um fragmento de 970 pb. Comparando-se os resultados obtidos no presente trabalho com os obtidos por Tenllado et al. (2003) foi observado que o tamanho do fragmento não influenciou na quantidade de material obtido. Em gel de agarose, foi possível a visualização de um fragmento presente em todas as amostras, exceto nas extraídas de bactérias que foram transformadas com plasmídeos sem inserto (Fig. 4). Para confirmar que esse fragmento se tratava de dsRNA, algumas amostras foram incubadas com RNase A (Fig. 5), a fim de degradar qualquer ssRNA presente nas amostras. Após esse tratamento, somente um fragmento, de aproximadamente 300 pb se manteve, confirmando se tratar de dsRNA de PDS. A concentração de dsRNA foi estimada com o uso de um marcador de massa molecular, resultando em 36 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, para PDS, e 34 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, para ferritina (Fig. 6).

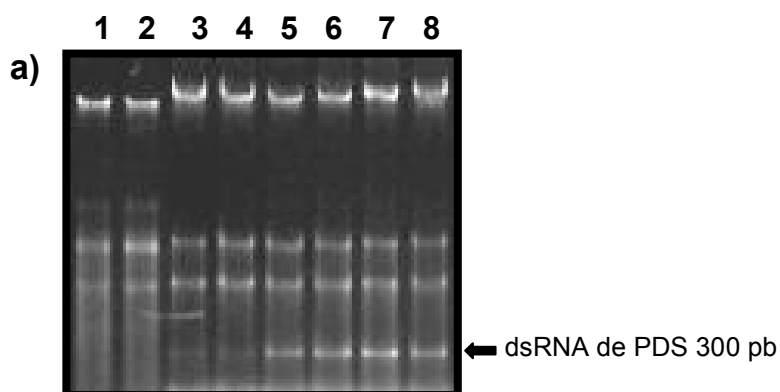


FIGURA 4. Visualização em gel de agarose dos produtos dos dsRNAs de PDS. Ácidos nucleicos totais de *E. coli* HT115 (DE3) induzidas à síntese de dsRNA de PDS; 1 e 2 – Ácidos nucleicos de bactérias transformadas com plasmídeos sem inserto; 3 a 8 – Ácidos nucleicos de bactérias induzidos à produção de dsRNA de PDS (~300 pb). Porto Alegre, RS, UFRGS/LFM, 2004.

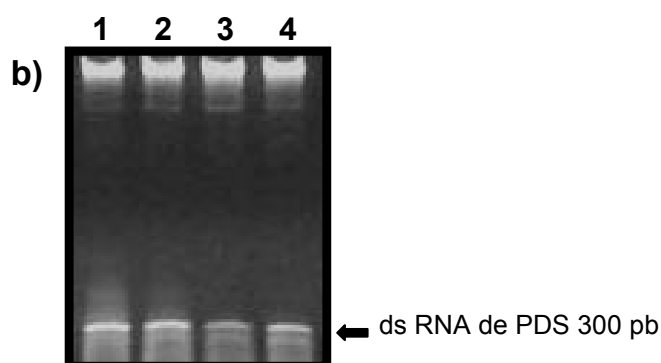


FIGURA 5. Visualização em gel de agarose dos produtos dos dsRNAs de PDS. Incubação do dsRNA de PDS com RNase A. 1 a 4 – Diferentes amostras de ácidos nucleicos totais provenientes de *E. coli* HT115 (DE3) transformadas com plasmídeos recombinantes para PDS, incubados com RNase A. Porto Alegre, RS, UFRGS/LFM, 2004.

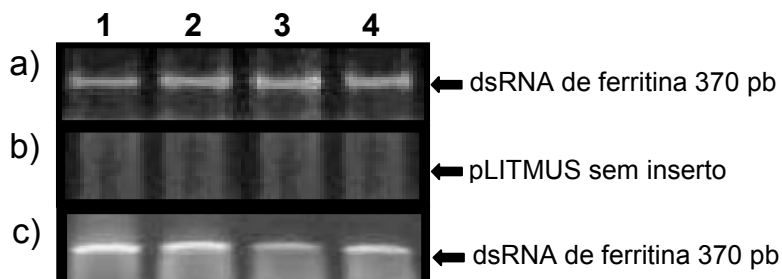


FIGURA 6. Visualização em gel de agarose dos produtos de dsRNAs de ferritina *in vivo*. a) 1 a 4 – Extração de RNA de *E. coli* HT115 (DE3) induzidas à síntese de dsRNA de ferritina (~370 pb); b) 1 a 4 – Controle constituído pelo vetor pLITMUS 38i sem inserto de cDNA de ferritina; c) 1 a 4 – dsRNA de ferritina incubado com RNase A (~370 pb). Porto Alegre, RS, UFRGS/LFM, 2004.

3.3.4 Síntese de siRNA de *pds* de arroz

Recentemente, diversos grupos têm utilizado RNase III de *E. coli* ou uma enzima Dicer recombinante humana para clivar dsRNAs transcritos *in vitro* em siRNAs, promovendo a formação de moléculas com múltiplas especificidades ao gene alvo. O método de inoculação de siRNAs tem sido muito utilizado em células de mamíferos, devido aos problemas que podem ser desencadeados pela utilização de moléculas de dsRNA com mais de 30 nucleotídeos (Dykxhoorn et al., 2003).

Além disso, estudos em *C. elegans* e *Drosophila melanogaster* têm claramente demonstrado que siRNAs sintéticos podem produzir efeitos similares àqueles de longos dsRNAs (Elbashir et al., 2001). Klahre et al. (2002), obtiveram sucesso no silenciamento da expressão da proteína GFP pela introdução de siRNAs em plantas de tabaco por bombardeamento de partículas.

Yoo et al. (2004) demonstraram, por microinjeção de siRNAs, que o silenciamento ocorre em nível celular. No entanto, quando eram inoculados pequenos ssRNAs com a presença de uma proteína envolvida no tráfego de mRNAs, a qual se liga preferencialmente a ssRNAs, foi verificado o movimento célula-a-célula e o desencadeamento do silenciamento.

Com base em estudos anteriores, foi utilizado siRNAs de PDS nas inoculações em arroz. No entanto, devido ao alto custo de síntese de siRNAs sintéticos, utilizou-se a enzima RNase III, a qual cliva os dsRNAs em moléculas de fita dupla de aproximadamente 21 nucleotídeos. Para isso, dsRNAs de PDS

produzidos *in vitro* foram digeridos e o produto da digestão foi visualizado em gel de poliacrilamida (Fig. 7).

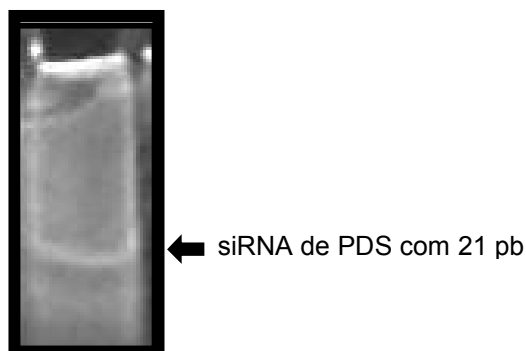


FIGURA 7. **Visualização em gel de poliacrilamida do produto de siRNA** de PDS *in vitro*. Produtos da digestão do dsRNA de PDS sintetizado *in vitro* com a enzima RNase III. Porto Alegre, RS, UFRGS/LFM, 2004.

3.3.5 Inoculação de dsRNA, ssRNA e siRNA em arroz

Com intuito avaliar a capacidade dos RNAs sintetizados em silenciarem o gene endógeno PDS em arroz, plantas crescidas em casa de vegetação foram inoculadas com soluções contendo dsRNA, ssRNA e siRNA, por meio de duas metodologias: abrasão ou infiltração.

A inoculação através da produção de ferimentos é um método freqüentemente utilizado para VIGS, como demonstrado por Ruiz et al. (1998) e por Tenllado e Días-Ruíz (2001). Já Tenllado et al., em 2003, obtiveram silenciamento em *N. benthamiana* por meio de inoculação de dsRNA diretamente sobre folhas, com ferimentos por abrasivos. Com base neste trabalho, nós utilizamos um abrasivo (carburundum) que causa ferimentos superficiais nas folhas de plantas de arroz, a fim de possibilitar a entrada das

moléculas de dsRNA de PDS e ferritina presentes em soluções aplicada sobre as plantas (Fig. 8). Foi utilizado um total de 36 plantas, sendo 18 plantas de arroz com 30 dias de crescimento e 18 plantas com 60 dias para aplicação de dsRNA de PDS. Dentre estas, 12 plantas foram inoculadas ácidos nucléicos totais contendo dsRNA sintetizado *in vivo*, 12 foram inoculadas com dsRNA produzido *in vitro*, seis com ssRNA produzido *in vitro*, duas com siRNAs, duas com a solução na qual os dsRNAs foram diluídos e duas com vetor vazio. Foram feitas inoculações com concentrações de 3, 5 e 7 µg das soluções de dsRNA produzidos tanto *in vivo* quanto para *in vitro*. No caso de ssRNA e siRNA foram inoculadas soluções contendo 3 µg. O mesmo experimento foi utilizado na aplicação de dsRNA e ssRNA de ferritina. Durante cinco semanas após a inoculação as plantas foram observadas e não foram verificadas diferenças visuais nas plantas inoculadas com dsRNA de PDS (Fig. 9).

Distintos métodos foram utilizados para o estudo e aplicação do PTGS em plantas. Neste trabalho, foi usado o método de aplicação de dsRNA por abrasivo, que havia se mostrado rápido e capaz de ser reproduzido em larga escala, de acordo com os resultados obtidos por Tenllado et. al. (2003). Neste estudo os autores obtiveram silenciamento de dois vírus, por meio de aspersão de extrato bruto de bactéria possuidora de dsRNA sobre folhas de *N. benthamiana* que foram previamente feridas com abrasivo. No entanto, nossos resultados diferiram dos obtidos no estudo citado. Com o uso do mesmo método de inoculação, não foi possível silenciar o gene pds. As principais diferenças entre o estudo citado e o presente trabalho são o gene alvo de silenciamento e a espécie de planta utilizada. Enquanto Tenllado et al. (2003)

tenham como alvo dois vírus em uma dicotiledônea, no presente trabalho o alvo do silenciamento foram genes endógenos em uma monocotiledônea. Uma vez que vírus tem replicação independente, podendo gerar várias cópias do seu genoma o que facilitaria a iniciação e a propagação do sinal de silenciamento. O gene PDS que é alvo neste trabalho tem cópia única no genoma do arroz o que poderia estar dificultando o início e a propagação do sinal. Estas diferenças poderiam explicar a ausência de silenciamento por meio dos métodos utilizados no presente trabalho.



FIGURA 8. Planta de arroz submetida à inoculação de dsRNA com uso de abrasivo. O material abrasivo foi adicionado à solução contendo dsRNA de PDS produzido *in vivo*. A solução de dsRNA foi aplicada em diferentes concentrações (3, 5 e 7 μg) em plantas com 30 e 60 dias de crescimento. Porto Alegre, RS, UFRGS/LFM, 2005

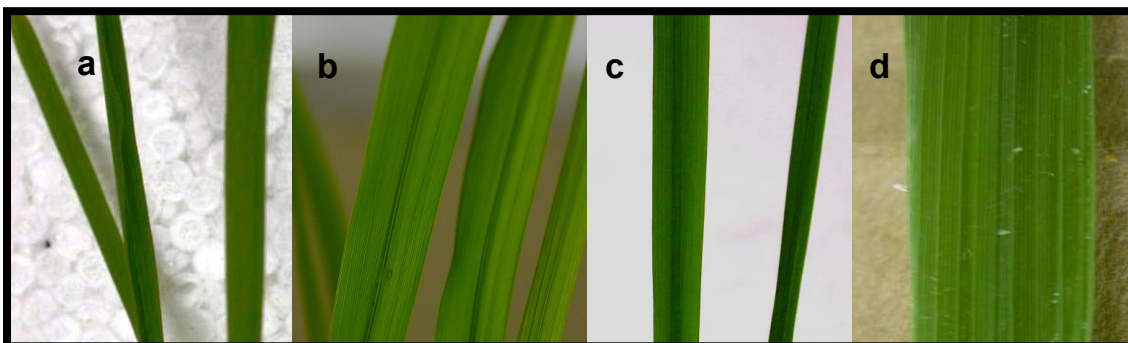


FIGURA 9. Plantas de arroz após inoculação de dsRNA *in vitro* e *in vivo* com uso de abrasivos. a) Plantas inoculadas com tampão de diluição (controle). b) Plantas inoculadas com dsRNA de PDS produzido *in vivo*; c) Planta inoculada com ssRNA de PDS; c) Planta inoculada com siRNA de PDS. Porto Alegre, RS, UFRGS/LFM, 2005.

Além da aplicação de dsRNA por meio de abrasivos, foi utilizado o método de inoculação por infiltração, demonstrado por Holzberg et al. (2002). Os autores obtiveram silenciamento do gene *pds* através do uso de um vírus (BSMV) contendo um fragmento do gene de interesse, o qual foi infiltrado em plantas de cevada. No presente trabalho, foram infiltradas soluções contendo dsRNA em 26 plantas, sendo 13 plantas de arroz com 30 dias de crescimento e 13 plantas com 60 dias para aplicação de dsRNA de PDS (Fig. 10a). Dentre estas, oito plantas foram inoculadas ácidos nucleicos totais contendo dsRNA produzido *in vivo*, oito foram inoculadas com dsRNA produzido *in vitro*, quatro com ssRNA produzido *in vitro*, duas com siRNA, duas com tampão de diluição e duas com vetor vazio. As concentrações das soluções utilizadas foram as mesmas do experimento citado anteriormente. Também utilizado essa metodologia de inoculação não foram observadas alterações visuais nas plantas (Fig. 10 b, c).

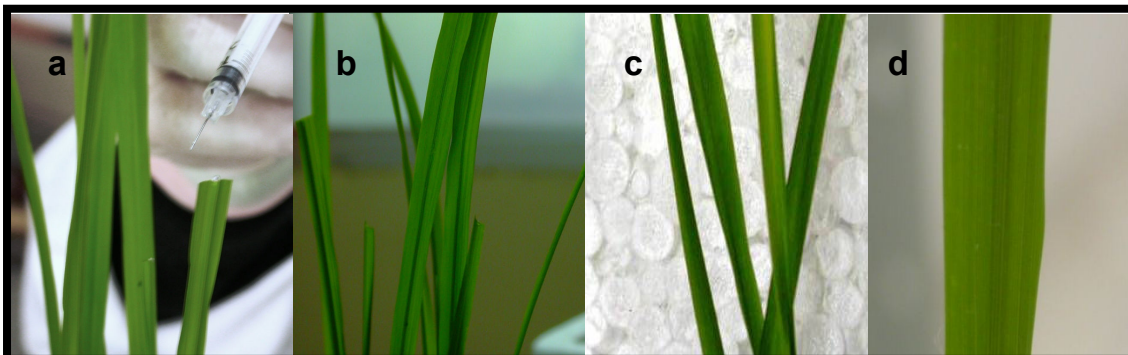


FIGURA 10. Plantas de arroz após infiltração de solução contendo dsRNA de PDS *in vitro* e *in vivo*. a) Plantas durante a infiltração; b) Planta de arroz 10 dias após a infiltração com dsRNA de PDS; c) Planta infiltrada com solução com tampão de diluição (controle); d) Folha infiltrada com siRNA de PDS. Porto Alegre, RS, UFRGS/LFM, 2005.

A principal diferença observada entre o presente trabalho e o estudo de Holzberg et al. (2002) consiste no material indutor de silenciamento infiltrado. Enquanto no estudo citado foi utilizado um vetor viral para silenciamento do gene *pds*, no presente trabalho foram utilizadas soluções contendo dsRNA.

Pela dificuldade observada no uso dos métodos de silenciamento através de aplicação de dsRNAs em monocotiledôneas, devido à arquitetura das folhas, foi decidido avaliar a mesma técnica em uma espécie onde a aplicação é mais simples. Desta forma, utilizou-se *N. benthamiana*, a mesma espécie utilizada por Tenllado et al. (2003), a fim de verificar se a ausência de silenciamento se deve a espécie utilizada (arroz), aos métodos de aplicação (abrasivo ou infiltração) ou ao tipo de material utilizado para inoculação (dsRNA).

3.3.6 Inoculação de dsRNA em *Nicotiana benthamiana*

Tendo em vista que não houve silenciamento em arroz pelos dois métodos de inoculação utilizados, foi testado dsRNA de arroz em *N. benthamiana*. Primeiramente, foi avaliada a similaridade entre o gene *pds* de arroz e de *N. benthamiana*, por meio de comparação pelo programa BLAST. Foi encontrada similaridade de 83% entre os genes *pds* das duas espécies. Foi demonstrado por Holzberg et al. (2002) que 88 % de similaridade é suficiente para obtenção do silenciamento. Os autores utilizaram o gene *pds* de cevada para silenciar o gene *pds* de arroz, milho e *N. benthamiana*, as quais apresentavam 90, 88 e 74% de similaridade, respectivamente. O silenciamento foi eficiente somente em plantas de arroz e milho.

Assim como realizado anteriormente, a inoculação de dsRNA de PDS de arroz foi feita, por abrasão e infiltração, em um total de 12 plantas de *N. benthamiana* com 40 dias de crescimento, sendo que quatro plantas foram inoculadas com dsRNA, quatro com ssRNA, duas com tampão de diluição e duas com vetor vazio. Plantas foram inoculadas com dsRNA sintetizado *in vivo* e *in vitro*. Da mesma forma, não foram observadas diferenças fenotípicas entre os tratamentos, apesar da similaridade de 83% entre os genes *pds* de *N. benthamiana* e arroz.

A fim de descartar que a pequena diferença estrutural do fragmento de dsRNA de *pds* de arroz em relação ao *pds* de *N. benthamiana* poderia impedir o silenciamento do gene *pds* de *N. benthamiana* foram sintetizados oligonucleotídeos a fim de amplificar o cDNA de *pds* desta espécie. O RNA de plantas de *N. benthamiana* foi extraído e submetido à RT-

PCR, amplificando um fragmento de 157 pb (Fig. 11). Este foi ligado em pLITMUS 38i e transformado em *E. coli* HT 115 (DE 3) As colônias foram utilizadas para realização de PCR para verificar a inserção do fragmento de interesse, com o uso de oligonucleotídeos iniciadores PDS-Nb FOR e REV, resultando em fragmentos de 157 pb para PDS (Fig.12). Por fim, os plasmídeos recombinantes foram seqüenciados confirmando se tratar de cDNA do gene de *pds*.

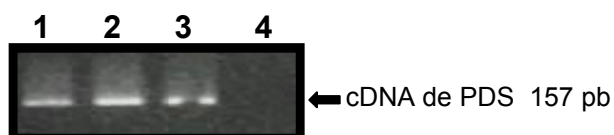


FIGURA 11. Produtos da amplificação do cDNA de *N. benthamiana*. Géis de agarose demonstrando padrões de amplificação do mRNA *N. benthamiana* separados por eletroforese. Produtos da RT-PCR, utilizando oligonucleotídeos iniciadores PDS-Nb For/Rev. 1 a 3 – cDNA de PDS de *N. benthamiana* (~157pb) ; 4 – Controle negativo. Porto Alegre, RS, UFRGS/LFM, 2005.

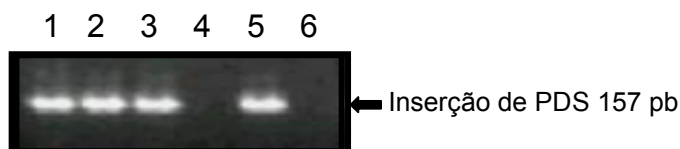


FIGURA 12. Produtos da amplificação de colônias transformadas com PDS de *N. benthamiana*. Produtos da PCR de colônias de *E. coli* HT115 (DE3) transformadas com PDS *N. benthamiana*, utilizando oligonucleotídeos iniciadores PDS-Nb FOR/REV. 1 a 3 e 5 – Colônias recombinantes para PDS N.b.; 4 – Colônia não recombinante; 6 – Controle negativo. Porto Alegre, RS, UFRGS/LFM, 2005.

Para testar as hipóteses levantadas anteriormente, reproduzimos o experimento realizado por Tenllado et al. (2003), com a diferença de que no nosso caso foi utilizado dsRNA para o silenciamento de genes endógenos. Embora utilizando a mesma cultura e modo de aplicação de dsRNA, não foi possível visualizar o silenciamento do gene *pds*. No método de inoculação por abrasivo, as plantas não apresentaram mudanças visuais, enquanto que no método por infiltração, a região infiltrada apresentou morte celular (Fig. 13). É

possível que o silenciamento não pôde ser verificado devido à morte celular localizada no ponto de inoculação, ou porque não houve a penetração dos dsRNA em células livres de danos.

A fim de verificar a alteração de pigmentação causada pelo silenciamento do gene *pds*, foi utilizado um agente químico, o herbicida Clomazone, o qual inibe a enzima PDS, causando foto-branqueamento das folhas, funcionando como um controle positivo neste trabalho. Foram aplicados 3 μ M do produto em folhas de plantas de arroz (Fig. 14) e de *N. benthamiana* (Fig. 15). Uma vez que a absorção do produto ocorre preferencialmente pelo meristema apical da planta e, uma vez que sua translocação ocorre pelo xilema, seguindo o fluxo da transpiração, os sintomas de sua atividade em plantas deverá manifestar-se nos órgãos mais novos (Rodrigues & Almeida, 1998). Cinco dias após a aplicação do herbicida foi possível observar a perda na coloração das mesmas, apresentado um fenótipo visível, o qual não foi observado nas plantas submetidas ao dsRNAs de PDS.

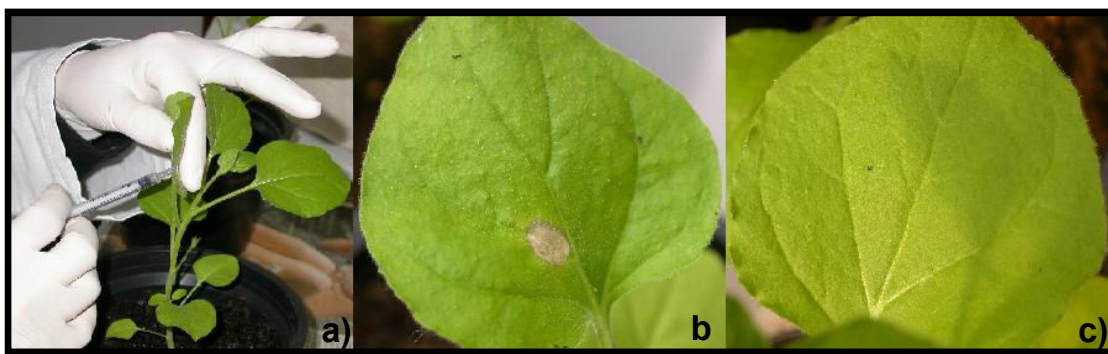


FIGURA 13. Plantas de *N. benthamiana* após infiltração de solução contendo dsRNA de PDS de *N. benthamiana in vitro*. a) Planta durante a infiltração; b) Detalhe da folha da planta aos 10 dias após a infiltração com dsRNA de PDS; c) Detalhe da folha de planta infiltrada com solução com tampão de diluição (controle). Porto Alegre, RS, UFRGS/LFM, 2005.

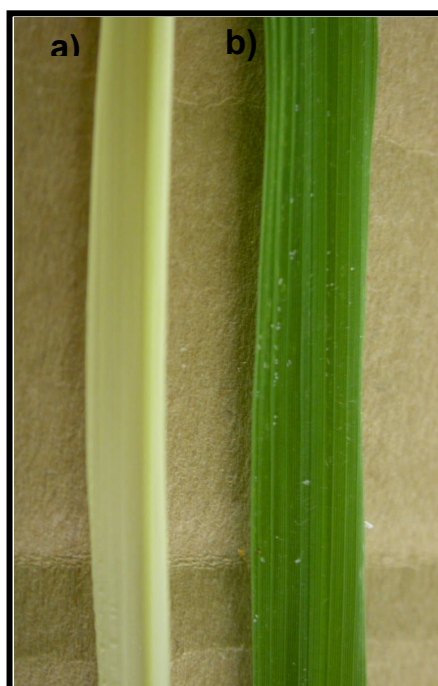


FIGURA 14 Tratamento com o herbicida Clomazone em arroz. Folhas de plantas de arroz tratadas (a) com Clomazone e (b) não-tratadas, cinco dias após a aplicação do produto. Porto Alegre, RS, UFRGS/LFM, 2005.

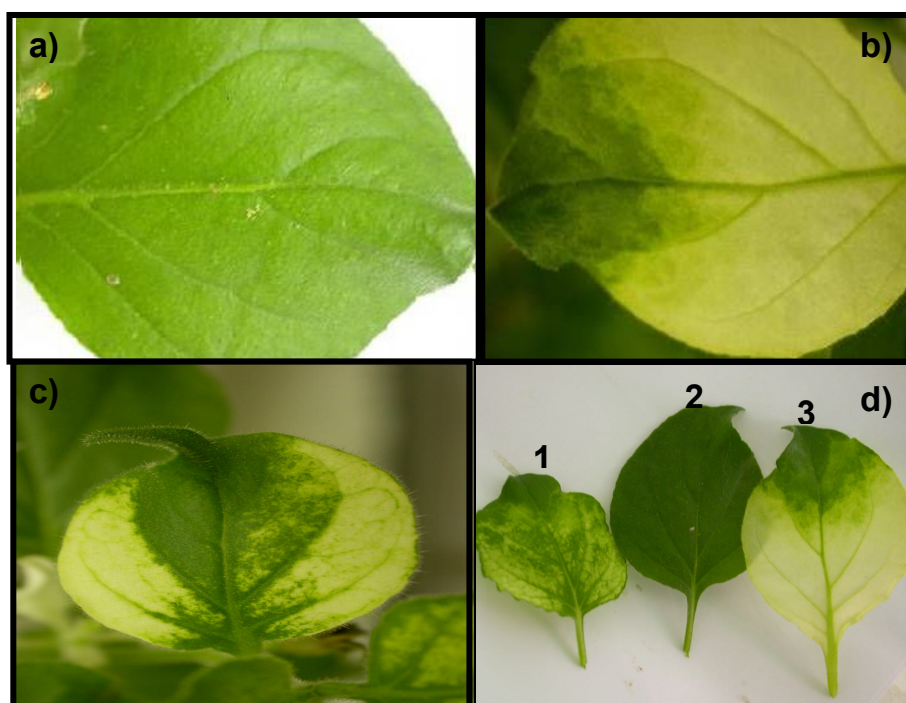


FIGURA 15. Tratamento com o herbicida Clomazone em *N. benthamiana*. Folhas de plantas de *N. benthamiana* não-tratadas (a), (b, c) tratadas com Clomazone, cinco dias após a aplicação do produto, (d1,3) Folhas em diferentes estágios de tratamento, (d2) controle folha não tratada com herbicida Clomazone. Porto Alegre, RS, UFRGS/LFM, 2005.

Tenllado et al., em 2004, descreveram que a razão de terem obtido silenciamento dos vírus PMMoV e PPV, através de extrato bacteriano contendo dsRNA aspergido em plantas de *N. benthamiana*, deve-se possivelmente a entrada dos dsRNAs juntamente com partículas virais. Winston et al em 2002, investigaram se o silenciamento gene específico era transmitido célula-a-célula, utilizando *C. elegans* mutantes para um gene que codifica uma proteína transmembrana. Através desse estudo os autores verificaram que o silenciamento não foi transmitido entre as células. Os autores relataram que para ocorrer silenciamento sistêmico são necessárias proteínas transmembrana, que exportam e importam o sinal RNAi ou que podem ser necessárias para a endocitose do sinal de RNAi, funcionando como um receptor.

Quando tomados em conjunto, os resultados obtidos no presente estudo e os relatos de outros estudos, pode-se concluir que existe a necessidade de moléculas que facilitem a entrada e a disseminação dos dsRNA para interior das células.

CAPÍTULO III

4 ADAPTAÇÃO DE VETORES PARA USO NO SILENCIAMENTO ESTÁVEL DO GENE CODIFICANTE DE FERRITINA

4.1 INTRODUÇÃO

O conhecimento do mecanismo de silenciamento gênico em nível de mRNA estimulou sua utilização como uma ferramenta na genômica funcional. Sua aplicação tem sido estudada extensivamente e aprimorada para facilitar a investigação de diferentes fenômenos na biologia vegetal (Baulcombe, 2002; Horiguchi, 2004).

O silenciamento em plantas pode ser induzido de diversas maneiras, uma das mais utilizadas é a transformação estável através de vetores que expressam dsRNA com repetições invertidas, formando um RNA em forma de grampo (hpRNA) (Vaucheret et al., 2001). Assim como ocorre com RNAs de fita duplas (dsRNAs), os hpRNAs, após serem introduzidos nas plantas, são degradados em fragmentos de aproximadamente 21 nucleotídeos, conhecidos como pequenos RNAs de interferência (siRNA). Esses fragmentos são incorporados no complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), guiando o complexo na degradação dos mRNAs complementares ao siRNA de fita simples ao qual está associado (Waterhouse & Helliwell, 2001).

Inicialmente, os estudos com silenciamento em plantas utilizavam construções estáveis com fragmentos de genes na orientação senso ou antisenso (Napoli et al., 1990). Entretanto, segundo Smith et al. (2000), a indução do silenciamento pode ser mais eficiente com o uso de vetores que expressam o fragmento do gene de interesse em ambas orientações, formando o hpRNA.

O hpRNA é composto por um promotor e um terminador de plantas, entre os quais estão as seqüências inversamente repetidas de um gene alvo, separadas por uma região espaçadora. O RNA transcrito a partir destes vetores se auto-hibridiza para formar uma estrutura pareada em forma de grampo, o qual possui uma “alça” de fita simples, codificada pela região espaçadora. Toda a repetição invertida pareada é utilizada para geração de siRNAs, mas pouco ou nenhum siRNA é gerado a partir da alça (Watson et al., 2005). Como a região espaçadora é necessária para estabilidade da construção, mas não está envolvida na produção de siRNAs, um íntron é freqüentemente utilizado como fragmento espaçador, especialmente porque parece aumentar a eficiência do silenciamento (Smith et al., 2000.; Wesley et al., 2001). Muitas construções com hpRNAs têm sido utilizadas em dicotiledôneas e expressas sob o controle do promotor 35S do Vírus do Mosaico da Couve-flor (CaMV). No entanto, promotores de expressão tecido-específica também têm sido efetivos na indução do silenciamento (Stoutjesdijk et al., 2002), como no caso de silenciamento em tecido floral de *A. thaliana* e *Brassica napus* (Byzova et al., 2004). Em grande parte dos estudos com o uso de hpRNAs, os fragmentos incorporados nesses vetores possuem entre 300 e

800 nucleotídeos, entretanto, fragmentos de 98 bases também têm se mostrado eficientes no silenciamento (Wesley et al., 2001).

Vetores que codificam hpRNAs podem ser introduzidos por transformação estável de plantas com transgenes que codificam hpRNAs ou RNAs virais. Além disso, esse tipo de vetor pode ser também utilizado em transformações transitórias por bombardeamento de partículas, por infiltração de plantas com *A. tumefaciens* contendo um plasmídeo recombinante ou ainda por infecção da planta com um vírus (Watson et al., 2005).

Uma grande variedade de genes, desde aqueles que codificam fatores de transcrição até enzimas biossintéticas, assim como seqüências virais, têm sido efetivamente silenciadas usando transgenes de hpRNA. Muitos dos fenótipos obtidos com essas construções são similares àqueles de mutantes de inserção (Wesley et al., 2001). Miki & Shimamoto (2004) utilizaram vetores semelhantes para transformações estável e transitória em arroz. A transformação estável foi realizada com *A. tumefaciens* carregando um vetor que codifica um hpRNA com repetições invertidas do gene *pds*. Já, para transformação transitória, foi utilizada uma variação do mesmo vetor, no qual foram retiradas as seqüências necessárias para transformação com *A. tumefaciens*. O vetor foi então inserido em plantas de arroz por bombardeamento de partículas para silenciamento da proteína GFP. Outro estudo foi desenvolvido em 2004 por Ogita et al., no qual os autores transformaram embriões somáticos de café por *A. tumefaciens* com vetores que codificam hpRNAs com fragmentos de genes intermediários da biossíntese de cafeína. Foi obtido silenciamento de até 100% em determinadas plantas.

Uma vantagem da utilização deste método de silenciamento consiste no uso de vetores que codificam hpRNAs para a supressão da atividade de famílias gênicas. Miki et al. (2005), por exemplo, construíram vetores com repetições invertidas para silenciamento da família de genes *OsRac*. Para isso, utilizaram um vetor no qual foi inserida uma região codificadora altamente conservada dos genes *OsRac* 1 ou 5 para inibir a expressão de toda a família gênica. Os níveis de mRNA dos genes *OsRac* 1 e 5 foram quase que totalmente suprimidos nas plantas transformadas.

Em face do exposto o presente trabalho teve como objetivo a construção de um vetor de silenciamento que codifica hpRNA para análise funcional do gene codificante de ferritina em arroz.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Material vegetal

Sementes de *Oryza sativa* dos cultivares EPAGRI 108 (tolerante a altas concentrações de ferro), e BR IRGA 409 (sensível a altas concentrações de ferro) foram cedidas pelo Instituto Rio-grandense do Arroz (IRGA). As mesmas foram germinadas em câmara de crescimento no escuro sob temperatura controlada de 28 °C. Após a germinação, as plântulas formadas foram transferidas para copos de plástico contendo substrato e colocadas em casa de vegetação com fotoperíodo de 12 h.

4.2.2 Extração de RNA

Folhas de plantas de arroz com 40 dias de crescimento foram utilizadas para a extração de RNA total, segundo método de Bugos et al. (1995) descrito no capítulo II.

4.2.3 Amplificação dos cDNAs de Ferritina

O RNA total de plantas de arroz foi submetido à técnica de transcrição acoplada à reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Os oligonucleotídeos iniciadores foram gerados a partir dos oligonucleotídeos iniciadores Ferr-F e Ferr-R, nos quais foram introduzidos sítios para as enzimas de restrição Spe I e Asc I (SaFerr-F, 5' – TAA CTA GTG GCG CGC CGC TAT GGA GTT GGC CTT G – 3'); e Avr II e Sgf I (SaFerr-R, 5' – CCA AAG CAA

AGA AGG TAG GGA TCC CGC TAG CGT A – 3'), para a orientação da inserção dos fragmentos. Primeiramente, foi realizado um processo de transcrição reversa (RT) na reação composta de 500 ng de RNA total, 320 μ M de cada dNTP, 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 3 mM de $MgCl_2$, 6,6 mM ditioneitol (DTT), 1,32 μ M de oligonucleotídeo iniciador reverso SaFerr-R e 6,4 U de enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen), sendo incubada a 37 °C por 1 h. Seguindo o procedimento, foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) no termociclador PTC-100™ (MJ Research), contendo a o volume total da reação de RT (5 μ L), 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 25 mM KCl, 2 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Invitrogen), 1 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen). O volume total das amostras foi de 25 μ L. As condições da PCR para amplificação do cDNA foi desnaturação inicial a 94 °C por 3 min; 35 ciclos constituídos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 65 °C por 30 s, extensão a 72 °C por 2 min, seguido de uma extensão final a 72 °C por 5 min. Os produtos das reações foram visualizados através da separação por eletroforese em gel de agarose 2% contendo tampão TBE, seguida da coloração em brometo de etídio (0,5 μ g.mL⁻¹). Um padrão de DNA (1kb DNA Ladder Invitrogen) foi incluído em cada gel. Os géis foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados através do sistema de fotodocumentação computadorizado EDAS 120 (Kodak Sciences 2d).

4.2.4 Inserção dos cDNAs

Os cDNAs de ferritina resultantes da amplificação com oligonucleotídeos iniciadores SaFerr-F e SaFerr-R foram ligados nas orientações senso e antisenso no vetor pMCG 161, obtido da coleção do Centro de Recursos Biológicos de Arabidopsis (ABRC, Fig 1). Para isso, tanto o inserto quanto o vetor passaram por duas etapas de inserção.

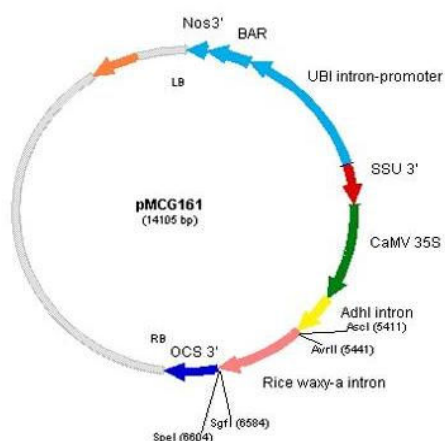


FIGURA 1 Vetor de silenciamento pMCG 161 adaptado de (<http://www.chromdb.org/>)

Na primeira etapa, para realizada a inserção na orientação senso. O cDNA de ferritina e o vetor pMCG 161 foram digeridos com as enzimas Avr II e Asc I (New england Biolabs). As reações de digestão (20 μ L) foram compostas por 20 μ g de cDNA de ferritina ou 20 μ g do vetor pMCG 161, 21 U das enzimas Avr II e Asc I, tampão (50 mM de acetato de potássio, 20 mM tris-acetato, 10 mM acetato de magnésio, 1 mM DTT, pH 7,9), e incubadas por 3 h a 37 °C. Os produtos das reações foram purificados pela adição de 10% de acetato de amônio 7,5 M e 2,5 x o volume de etanol 100%. O material foi homogeneizado

e precipitado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 h, seguido de centrifugação a $16.000 \times g$ por 20 min ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$). O líquido sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70%, sendo centrifugado a $16.000 \times g$ por 5 min e solubilizado em água ultra pura.

Na segunda etapa, o vetor pMCG 161, contendo o fragmento na orientação senso foi preparado para receber o inserto na orientação antisenso. As reações (20 μL) de digestão foram compostas por 20 μg de cDNA de ferritina e 20 μg de vetor pMCG 161 possuidor do cDNA na orientação senso, 21 U das enzimas *AsiS* I e *Spe* I, tampão (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, pH 7,9), e incubadas por 3 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e por 20 min a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para inativação das enzimas.

Os produtos das reações foram visualizados através da separação por eletroforese em gel de agarose 2% contendo tampão TBE, seguida da coloração em brometo de etídio ($0,5\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$). A concentração do material digerido foi estimada com a utilização de marcador de peso molecular λ *Hind* III (Promega). Os géis foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados como descrito anteriormente.

As reações de ligação (20 μL) em ambas orientações foram compostas de 15 ng de cDNA de ferritina, 100 ng do vetor pMCG 161, 1 U de T4 DNA Ligase e tampão de ligação (25 mM de Tris-HCl, pH 7,6, 5 mM MgCl_2 , 0,5 mM DTT, 0,5 mM ATP, 25% polietilenoglicol 8000) e incubadas durante 18 h a $14\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.5 Transformação em *Escherichia coli*

Células eletrocompetentes de *E. coli* XL1-Blue foram preparadas segundo manual Micro Pulser™ (Bio-Rad), conforme instruções do fabricante. As reações de ligação (100 ng) foram misturadas com 40 µL de células eletrocompetentes e transformadas por eletroporação (Micro Pulser™ Bio-Rad) em cubetas de 0,1 cm, em uma voltagem de 1,8 kV. Em seguida, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio líquido Luria-Bertani (LB – 1% peptona, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl, pH 7,5) e mantidas a 37 °C a 250 rpm. Após 1 h, 200 µL de células bacterianas foram plaqueadas em meio LB acrescido de cloranfenicol (25 µg.mL⁻¹) e mantidas em estufa a 37 °C por 16 h.

4.2.6 Seleção de colônias transformadas

As colônias de *E. coli* XL1-Blue contendo o plasmídeo recombinante, foram repicada para placas contendo meio LB acrescido de cloranfenicol (25 µg.mL⁻¹), para a confirmação da clonagem e obtenção de maior quantidade de material bacteriano.

Para confirmação da inserção do fragmento do gene codificante de ferritina senso e antisenso em pMCG 161, as colônias obtidas foram submetidas a uma reação de PCR com oligonucleotídeos SaFerr-F e SaFerr-R. Foi realizada a PCR (25 µL) contendo 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (Invitrogen), 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 25 mM KCl, 2,0 mM MgCl₂, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo e parte de cada colônia de bactéria transformada, coletadas com a utilização de ponteiros plásticos descartáveis. A PCR foi realizada no termociclador PTC-

100™ (MJ Research), nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 3 min; 35 ciclos constituídos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 65 °C por 30 s, extensão a 72 °C por 2 min, seguido de uma extensão final a 72 °C por 5 min. Os produtos da reação foram visualizados através da eletroforese em gel de agarose 1% contendo tampão TBE, seguida da coloração em brometo de etídio (0,5 µg.mL⁻¹). Um padrão de DNA (1kb DNA Ladder Invitrogen) foi incluído em cada gel. O gel foi fotografado como descrito anteriormente.

4.2.7 Extração de plasmídeos recombinantes

A extração de plasmídeos foi baseada na técnica descrita por Brasileiro & Carneiro (1998). Três colônias foram transferidas para 3 mL de meio LB líquido com adição de cloranfenicol (25 µg.mL⁻¹), sob agitação (250 rpm) em torno de 16 h a 37 °C. A extração seguiu como descrito no capítulo II.

4.2.8 Reação de seqüenciamento e análise de similaridade das seqüências

O seqüenciamento e a análise de similaridade foram realizados como descrito no capítulo II. O oligonucleotídeo iniciador utilizado no seqüenciamento foi SaFerr-Ver (CCA AAG CAA AGA AGG TAG GGA TCC CGC TAG CGT A)

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma das formas de aplicação do silenciamento consiste na utilização de vetores que expressam dsRNA com repetições invertidas, formando um hpRNA (Vaucheret et al., 2001). Esse tipo de vetor pode ser utilizado para transformação estável ou transitória.

No presente trabalho, foi utilizado o vetor pMCG 161, o qual possui 14.105 pb, um cassete de expressão sob a regulação do promotor CaMV 35S, um gene que confere resistência ao antibiótico cloranfenicol como agente seletivo em bactéria e um gene que confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio (Finale®) como agente seletivo em plantas. Este vetor apresenta dois sítios de clivagem, cada um construído a fim de facilitar as inserções nas orientações do inserto senso e antisenso, possuindo uma seqüência interveniente (íntron Rice Waxy-a), a qual facilita a formação do hpRNA.

Miki & Shimamoto (2004), obtiveram silenciamento do gene *pds* em arroz com a utilização de um vetor com características semelhantes ao utilizado no presente trabalho. Entretanto, no estudo citado, a seqüência interveniente utilizada foi um fragmento do gene *gus*, o qual forma uma conexão entre as duas repetições invertidas. Outro estudo que demonstrou sucesso com o uso de vetor similar foi o de Wang et al. (2005), também para silenciamento do gene *pds* em *A. thaliana*. Além do gene *pds*, muitos outros genes foram silenciados através de transformação estável utilizando vetor que codifica um hpRNA. Em uma revisão de 2002, Waterhouse & Helliwell

relataram exemplos de genes endógenos de plantas que foram silenciados por hpRNA.

Com o objetivo de adaptar o vetor de silenciamento para análise da função do gene codificante de ferritina *in vivo*, foi utilizado um fragmento do cDNA de ferritina de arroz. A proteína ferritina é encontrada em diversos organismos, sendo responsável por estocar e distribuir ferro nesses organismos (Goto et al. 1998). A ferritina tem duas importantes funções em plantas: estocar o ferro, elemento requerido por enzimas envolvidas na fotossíntese e outros processos respiratórios (Goto et al. 2000), e proteger as células contra o estresse oxidativo causado pelo ferro livre (Briat et al. 1995).

Devido às características da proteína ferritina, acredita-se que esta possa estar ligada à tolerância a alta concentração de ferro presente no solo apresentada por alguns cultivares de arroz. A análise funcional deste gene *in vivo* se torna necessária, pois a toxidez por ferro causa grandes perdas na produtividade no cultivo de arroz (SILVA, 2003).

Para adaptação do vetor pMCG 161, folhas de plantas de arroz cultivadas em casa de vegetação foram utilizadas para extração de RNA total, o qual foi submetido à RT-PCR para obtenção dos cDNAs de ferritina. Foram gerados produtos únicos de 290 pb (Fig. 2) conforme o esperado segundo a localização dos oligonucleotídeos iniciadores na seqüência do cDNA.

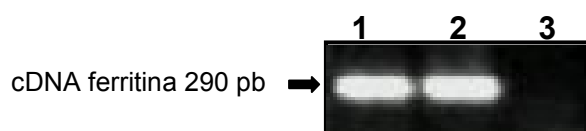


FIGURA 2. Produtos da amplificação do mRNA de *Oryza sativa*. Géis de agarose demonstrando padrões de amplificação do mRNA de *O. sativa* separados por eletroforese. Produtos da reação de RT-PCR, utilizando oligonucleotídeos iniciadores SaFerr-F e SaFerr-R. 1 a 2 – cDNA de ferritina; 3 – controle negativo. Porto Alegre, RS, UFRGS/LFM, 2005.

Para a inserção na orientação senso, o produto da PCR e o vetor foram digeridos com enzimas de restrição Asc I e Avr II. O fragmento foi ligado no vetor pMCG 161 (Fig. 3) e o produto da reação foi utilizado para transformação de células eletrocompetentes de *E. coli* XL1-Blue.

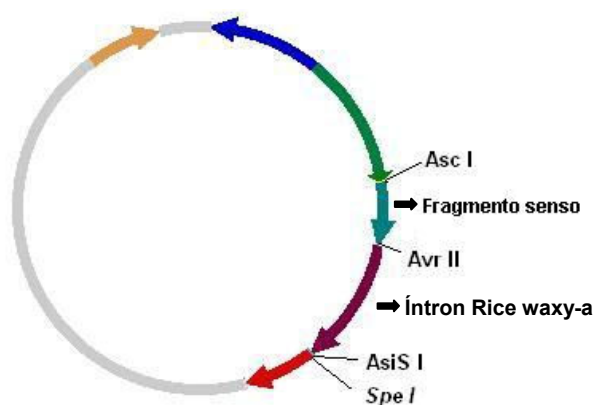


FIGURA 3. Figura esquemática da inserção do cDNA do gene codificante de ferritina na orientação senso. Adaptada de (<http://www.chromdb.org/plasmids/fig2.jpg>).

Para confirmar que as colônias recombinantes possuíam a inserção de interesse, foi realizada PCR das mesmas. De 70 colônias, 15 foram analisadas por PCR. Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores (SaFerr-F e SaFerr-R). Todas as colônias analisadas continham a inserção de interesse (Fig. 4). Para confirmação do inserto do cDNA de ferritina no vetor de silenciamento foi realizada uma reação de digestão com as enzimas Asc I e Spe I, baseadas no vetor (Fig. 5). Por fim, os plasmídeos recombinantes foram seqüenciados confirmando se tratar de cDNA de ferritina.

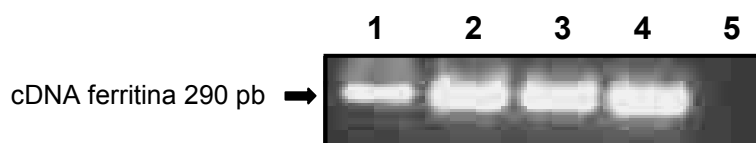


FIGURA 4. Produtos da amplificação de colônias transformadas. Produtos da PCR de colônias de *E. coli* XL1-Blue transformadas compMCG 161 com fragmentos do gene codificante de ferritina, utilizando oligonucleotídeos iniciadores SaFerr For e SaFerr 1 a 4– amplificação de fragmento do gene codificante de ferritina; 5 – Controle negativo. Porto Alegre, RS, UFRGS/LFM, 2005

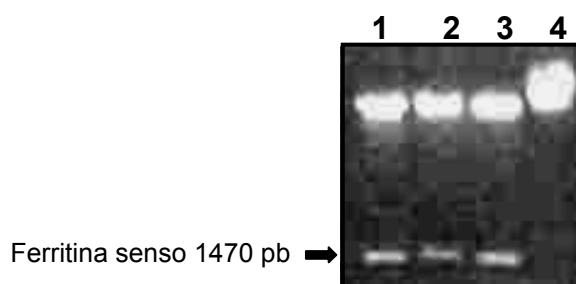


FIGURA 5. Produtos da reação de digestão após inserção cDNA na orientação senso. Produtos da digestão de plasmídeos recombinantes para confirmação do fragmento na orientação senso. Utilizando enzima de restrição *Asc* I e *Spe* I, gerando um fragmento, de 1470 pb, onde 290 pb corresponde ao cDNA de ferritina e 1180 pb da seqüência interveniente (intron). 1 a 3 – plasmídeos recombinates possuindo cDNA de ferritina; 4 – Controle com plasmídeos vazio. Porto Alegre, RS, UFRGS/LFM, 2005.

Para a inserção na orientação antisenso, o produto da PCR e o plasmídeo recombinante foram digeridos com enzimas de restrição *AsiS* I e *Spe* I. O fragmento foi ligado no vetor (Fig.6) e o produto da reação foi utilizado para transformação de células eletrocompetentes de *E. coli* XL1-Blue. Das 50 colônias obtidas, 15 foram analisadas por PCR. Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores (SaFerr-F -SaFerr-F), a fim de amplificar os dois fragmento inseridos além da seqüência interveniente. Entre as colônias analisadas oito apresentaram a inserção antisenso (Fig. 7).

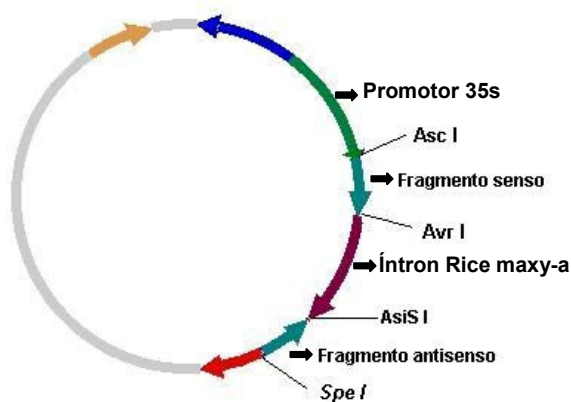


FIGURA 6. Figura esquemática demonstrando as inserções dos cDNAs na orientação senso e antisense. Adaptada de (<http://www.chromdb.org/plasmids/fig2.jpg>).

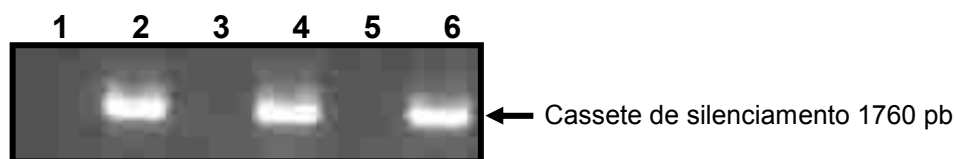


FIGURA 7. Produtos da amplificação de colônias transformadas. Produtos da PCR de colônias de *E. coli* XL1-Blue transformadas com pMCG 161 com fragmentos do gene codificante de ferritina, utilizando oligonucleotídeos iniciadores SaFerr FOR e SaFerr FOR. 2, 4 e 6 – amplificação do fragmento do cassete de silenciamento, contendo os cDNAs na orientação senso e antisense, além da seqüência interveniente, amplificando (~1760 pb); 1 - controle negativo; 3 e 5 – plasmídeos não recombinantes. Porto Alegre, RS, UFRGS/LFM, 2005.

Entretanto, até o momento não foram realizados ensaios em plantas de arroz para testar a eficiência deste vetor. O aprimoramento das metodologias de silenciamento em plantas, bem como métodos de transformação estável mais eficientes, poderão resultar em uma ferramenta muito útil para a análise funcional em larga escala de genes de arroz. Como já tem sido demonstrado em *A. thaliana*, planta modelo na qual transformações estáveis têm sido realizadas com sucesso por meio de transformação floral via *A. tumefaciens* (Bent et al., 2000).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método de síntese de dsRNA *in vivo* foi eficiente tanto quanto o método de síntese *in vitro*, e apresenta vantagens em termos de custo e produção em larga escala

Não foi possível detectar silenciamento do gene *pds* em arroz e *N. benthamiana* através de inoculação por abrasivo ou infiltração de dsRNAs de *pds*.

A ausência de silenciamento não pode ser atribuída ao tipo de molécula de dsRNA utilizada, longo ou siRNA, ou da espécie de planta.

Foi possível adaptar o vetor de silenciamento pMCG 161, com insertos na orientação senso e antisenso para futuro uso no silenciamento em arroz.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, N. et al. RNA interference: Biology, mechanism and applications. Microbiology and Molecular **Biology Reviews**, Washington, v.67, n.4, p.657-685, 2003.

AZEVEDO C. The RAR1 interactor SGT1, an essential component of R gene-triggered disease resistance. **Science**, Washington, v.295, p.2073-2076, 2002.

BARTEL, D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, Cambridge, v.116, p.281-297, 2004.

BAULCOMBE, D. RNA silencing. **Current Biology**, Cambridge, v.12, n.3, p.R82-R84, 2002.

BAULCOMBE, D. RNA silencing in plant. **Nature**, London, v.431, p.356-363, 2004.

BENEDITO, V.A. et al. The potential of virus-induced gene silencing for speeding up functional characterization of plant genes. **Genetics and Molecular Research**, Brasil, v.3, p.323-341, 2004.

BENT, A.F. Arabidopsis in planta transformation. Uses, mechanisms, and prospects for transformation of other species. **Plant Physiology**, Lancaster, v.124, p.1540-1547, 2000.

BURTON, R.A. et al. Virus-induced silencing of a plant cellulose synthase gene. The **Plant Cell**, Rockville, v.5, p.691-706, 2000.

BYZOVA, M. et al., Transforming petals into sepaloid organs in *Arabidopsis* and oilseed rape: implementation of the hairpin RNA-mediated gene silencing technology in an organ-specific manner. **Planta**, Berlin, v.218, p.379-387, 2004.

CASTRO, E.M. et al. Melhoramento do Arroz. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de Espécies Cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999.

CHEN S. et al. Distribution and characterization of over 1000 T-DNA tags in rice genome. **Plant journal** , Warszawa, v. 36, p.105-103, 2003.

DALMAY, T. et al. Potato Virus X amplicons in *Arabidopsis* mediate genetic and epigenetic gene silencing. **The Plant Cell**, Rockville, v.12, p.369-379, 2000.

DYKXHOORN, D.M.; NOVINA, C.D.; SHARP, P.A. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, London, v.4, p.457-467, 2003.

ELBASHIR, S.M. et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. **Nature**, London, v.411, p. 494-498, 2001.

ESCOBAR, M.A. et al. RNAi-mediated oncogene silencing confers resistance to crown gall tumorigenesis. **Proceedings of the Indian National Science Academy**, New Delhi, v.98, p.13437-13442.

FENG, Q. et al. Sequence and analysis of rice chromosome 4. **Nature**, London, v.420, p.316-320, 2002.

FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, London, v.391, p.806-811, 1998.

FISCHER, K.S et al. Collaborations in rice. **Science**, Washington, v.290, p.279-280, 2000.

GOFF, T. et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. Japonica). **Science**, Washington v.296, p.92-100, 2002.

GOTO, F.; YOSHIHARA, T.; SAIKI, H. Iron accumulation in tobacco plants expressing soyabean ferritin gene. **Transgenic Research**, London, v.7, p.173-180, 1998.

GOTO, F.; YOSHIHARA, T.; SAIKI, H. Iron accumulation and enhanced growth in transgenic lettuce plants expressing the iron-binding protein ferritin. **Theor Appl Genet**, Berlin, v.100, p.658-664, 2000.

HAMILTON, A.J. et al. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. **The EMBO Journal**, Oxford, v.21, p.4671-4679, 2002.

HANNON G.J. RNA interference. **Nature**, London, v.418, p.244-251, 2002.

HIETER, P.; BOGUSKI, M. Functional genomics: it's all how you read it. **Science**, Washington, v.278, p.601-602, 1997.

HOLZBERG, S. et al. *Barley stripe mosaic* virus-induced gene silencing in a monocot plant. **The Plant Journal**, Oxford, v.30, p.315-327, 2002.

HORIGUCHI, G. RNA silencing in plants: a shortcut to functional analysis. **Differentiation**, London, v.72, p.65-73, 2004.

IZAWA, T.; SHIMAMOTO, K. Becoming a model plant: the importance of rice to plant science. **Trends in plant science**, Kidlington, v.1, p.95-99.

JONES, L.; RATCLIFF, F.; BAULCOMBE, D.C. RNA-directed transcriptional gene silencing in plant can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met I for maintenance. **Curr. BIO**, Amsterdam, v.11, p.747-757, 2001.

KETTING, R. et al. mut-7 of *C. elegans*, required for transposons silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RnaseD. **Plant Cell**, Rockville, v.99, p.133-141, 1999.

KHUSH, G.S.; BRAR, D.S. Rice genetics from Mendel to functional genomics. In: KHUSH, G.S.; BRAR, D.S.; HARDY, B. (Eds) Rice Genetics IV. **Proceedings of the Fourth International Rice Genetics Symposium**, New Delhi (India): Science Publishers: IRRI – International Rice Research Institute. Los Baños, Philippines. 22-27 October 2000. 488p.

KJEMTRUP, S. et al. Gene silencing from plant DNA carried by geminivirus. **The Plant Journal**, Oxford, v.14, p.91-100, 1998.

KLAHRE, U. et al. High molecular weight RNAs and small interfering RNAs induce systemic post-transcriptional gene silencing in plants. **Acta Academiae Scientiarum Polonae**, USA, v. 99, p.11981-11986, 2002.

KUMAGAI, M.H. et al. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, Washington, v.92 p.1679-1683, 1995.

LECELLIER, C.H.; VOINNET O. RNA silencing: no mercy for viruses? **Immunological Reviews**, Copenhagen, v.198, p.285-303, 2004.

LIU, Y.; SCHIFF, M.; DINESH-KUMAR, S.P. Virus-induced gene silencing in tomato. **The Plant Journal**, Oxford, v.31, p.777-786, 2002.

LUKOWITZ W. et al. Positional cloning in *Arabidopsis*. Why it feels good to have a genome initiative working for you. **Plant Physiology**, Lancaster, v.123, p.795-805, 2000.

MACLEAN J.P. et al.. Los Baños: International Rice Research Institute, Bouaké: West Africa Rice Development Association, Cali: International Center for Tropical Agriculture, Rome: Food and Agriculture Organization, **Rice almanac**, v.1, p. 253, 2002.

MEAGHER, R. Post-genomics networking of biotechnology for interpreting gene function. **Current Opinion in Plant Biology**, Londres, v.5, p.135-140, 2002.

MEISTER, G.; TUSCHI, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. **Nature**, London, v.431, p.343-349, 2004.

MELLO, C.C.; CONTE, JR D. Revealing the world of RNA interference. **Nature**, London, v.431, p.338-342, 2004.

MIKI, D.; SHIMAMOTO, K. Simple RNAi vectors for stable and transient suppression of gene function in rice. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v.45, p.490-495, 2004.

MIKI, D.; ITOH R.; SHIMAMOTO, K. RNA silencing of single and multiple members in a gene family of rice. **Plant Physiology**, Lancaster, v.138, p.1903-1913, 2005.

MURATA, T.; SUGAI, M. Photoregulation of Asymmetric Cell Division Followed by Rhizoid Development in the Fern *Ceratopteris rothalli*. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v.12, p.1313–1320, 2000.

NAKANO, H. et al. RNA interference for the organizer-specific gene *Xlim-1* in *Xenopus* embryos. **Biochem. Biophys**, New York, v.274, p.434–439, 2000.

NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. **The Plant Cell**, Rockville, v.2, p.279-289, 1990.

NOVINA, C.D.; SHARP, P.A. The RNAi revolution. **Nature**, London, v.430, p.161-164, 2004.

OGITA, S. et al. Application of RNAi to confirm theobromine as the major intermediate for caffeine biosynthesis in coffee plants with potential for construction of decaffeinated varieties. **Plant Molecular Biology**, The Hague v.54, p.931-941, 2004.

PALATNIK, J.F. et al, Control of leaf morphogenesis by microRNAs. **Nature**, London, v.425, p.257-263, 2003.

PALAUQUI, J. C. et al. Systemic acquired silencing: Transgene specific posttranscriptional gene silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to nonsilenced scions. **EMBO journal**, Eynsham, v.16, p.4738-4745, 1997.

RAPONI, M.; ARNDT G. M. Double-stranded RNA-mediated gene silencing in fission yeast. **Nucleic Acid Research** , London, v. 31, p.4481–4489. 2003.

RATCLIFF, F. et al. Gene silencing without DNA:RNA-mediated cross protection between viruses. **Plant Cell**, Rockville, v.11, p.1207-1215, 1999.

RENSINK, W.A.; BUELL, C.R. *Arabidopsis* to rice. Applying knowledge from a weed to enhance our understanding of a crop species. **Plant Physiology**, Lancaster, v.135, p.622-629, 2004.

RUIZ, M.T.; VOINNET, O.; BAULCOMBE, D.C. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. **The Plant Cell**, Rockville, v.10, p.937-946, 1998.

SASAKI, T.; BURR, B. International rice genome sequencing project. **Plant Curr Opin Plant Biol**, London, v.3, p.138-141, 2000.

SCHIMIDT R. Synteny: recent advance and future prospects. **Curr Opin Plant Biol**, London, v.3, p.97-102, 2000.

SCHIMIDT R. Plant genome evolution: lessons from comparative genomics at the DNA level. **Plant Molecular Biology**, The Hague v.48, p.21-37, 2002.

SILVA, M.M. et al. Method development for the determination of iron in milligram amounts of rice plants (*Oryza sativa* L.) from cultivation experiments using furnace atomic absorption spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, 2003.

SMITH, N.A. et al. Total silencing by intron-spliced harpin RNAs. **Nature**, London, v.407, p.319-320, 2000.

STANISLAWSKA, J.; OLSZEWSKI, W.L. RNA interference – significance and applications. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, Warszawa, v.53, p.39-46, 2005.

STOUT, S.C. et al. Rapid and Efficient Suppression of Gene Expression in a Single-Cell Model System, *Ceratopteris richardii*. **Plant Physiology**, Lancaster, v.131, p.1165-1168, 2003.

STOUTJESDIJK, P.A. et.al., hpRNA-mediated targeting of the *Arabidopsis* FDA2 gene gives highly efficient and stable silencing. **Plant Physiology**, Lancaster, v.129, p.1723-1731, 2002.

TABARA, H.; GRISHOK, A.; MELLO, C.C. RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. **Science**, Washington, v.282, p.430-431, 1998.

TENLLADO, F. & DÍAZ-RUÍZ, J.R. Double-stranded RNA-mediated interference with plant virus infection. **Journal of Virology**, Baltimore, v.75, p.12288–12297, 2001.

TENLLADO, F. et al. Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections. **BMC Biotechnology** (electronic resource), London, 2003.

TENLLADO, F.; LLAVE C.; DÍAZ-RUÍZ, J.R. RNA interferente as a new biotechnological tool for the control of virus diseases in plants. **Virus Research**, Amsterdam, v.102, p.85-96, 2004.

TIMMONS, L., COURT, D.L.; FIRE, A. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. **Gene**, Amsterdam, v.263, p.103-112, 2001.

TYAGI, A.K.; MOHANT, A. Rice transformation for crop improvement and functional genomics. **Plant science**, Shannon, v.158, p.1-18, 2000.

TYAGI, A.K. et al. Structural Genome-wide molecular approaches in plants: From structure to function. **Plant Breeding**, Warszawa, v.1, p. 235-250, 2003.

TYAGI, A.K. et al. Structural and functional analysis of rice genome. **Journal of Genetics**, London, v.83, p.79-99, 2004.

VAUCHERET, H.; BÉCLIN C.; FAGARD, M. Post transcriptional gene silencing in plants. **Journal of Cell Science**, London, v.114, p.3083-3091, 2001.

VOINNET, O.; LEDERER, C.; BAULCOMBE, D.C. A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. **Cell**, Cambridge, v.103, p.157-167, 2000.

VOINNET, O. RNA silencing as a plant immune system against viruses. **Trends in Genetics**, Amsterdã, v.17, n.8, p.449-459, 2001.

WANG, M.B.; METZLAFF, M. RNA silencing and antiviral defense in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.8, p.216-222, 2005.

WARGELIUS, A. et al. Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos. **Biochem. Biophys**, New York, v.263, p.156–161. 1999.

WATERHOUSE, P. M.; WANT, M.B. AND LOUGH, T. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. **Nature**, Lodon, v.411, p.834-842, 2001.

WATERHOUSE, P. M. Plant gene silencing applications. **Plant**, Warszawa, v. 5, p.1-3, 2002.

WATERHOUSE, P.M.; HELLIWELL, C.A. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. **Nature Reviews Genetics**, London, v.4, p.29-38, 2002.

WATSON, J.M. et al. RNA silencing platforms in plants. *Plant Industry*, Canberra, v.579, p 5982–5987, 2005.

WESLEY, S.V. et al. Construct design for efficient, effective and highthroughput gene silencing in plants. **The Plant Journal**, Oxford, v.27, p.581-590, 2001.

WINSTON, W.M.; MOLODOWITCH, C.; HUNTER C.P. Systemic RNAi in *C. elegans* Requires the Putative Transmembrane Protein SID-1. **Science**, Washington, v. 295, p. 2456 – 2459, 2002.

WU, J.; MAEHARA, T.; SHIMOKAWA, T. et al. A comprehensive rice transcript map containing 6591 expressed sequence tag sites. **Plant Cell**, Rockville, v.14, p.525-535, 2002.

WU-scharf, D. et al. Transgene and transposons silencing in *Chlamydomonas reinhardtii* by a DEAH-Box RNA helicase. **Science**, Washington, v.290, p.1159-1162, 2000.

XU, Y. et al. How can we genomics to improve cereals with rice as a reference genome? **Plant Molecular Biology**, The Hague v.59, p.07-26, 2005.

YAZAKI, J. et al. Embarking on rice functional genomics via cDNA microarray: use of 3' UTR probes for specific gene expression analyses. **DNA research**. Tokyo, v.7, p.367-370, 2000.

YOO, B.C. et al. A systemic small RNA signaling system in plants. **Plant Cell**. Rockville, v.8, p.1979-2000, 2004.

YU, J. et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica). **Science**, Washington, v.296, p.79-92, 2002.

ZILBERMAN, D.; CAO X.; JACOBSEN, S.E. ARGONAUTE4 control of locus specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. **Science**, Washington, v.299, p.716-719, 2003.